

Daniel Ferreira Holderbaum

**EFEITOS CRÔNICOS DE MILHO TRANSGÊNICO (MON810)
NA DIETA DE *Daphnia magna***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Inácio Orth

Coorientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Florianópolis
2012

Holderbaum, Daniel Ferreira

Efeitos crônicos de milho transgênico (MON810) na dieta de *Daphnia magna* [dissertação] / Daniel Ferreira Holderbaum ; orientador, Afonso Inácio Orth ; coorientador, Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC, 2012.

91 p. il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Transgênicos. 3. Biossegurança. 4. Avaliação de Risco. 5. Toxicologia. I. Orth, Afonso Inácio. II. Nodari, Rubens Onofre. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Daniel Ferreira Holderbaum

**EFEITOS CRÔNICOS DE MILHO TRANSGÊNICO (MON810)
NA DIETA DE *Daphnia magna***

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 19 de Julho de 2012.

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Afonso Inácio Orth, Dr. Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr. Corientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Yoshio Kageyama, Dr.
Universidade de São Paulo

Prof. Fernando Souza Rocha, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Graça.

Aos meus pais, Virson Holderbaum e Sonia Ferreira Holderbaum, pelo seu incentivo e amparo em todos os momentos.

Aos meus irmãos, André, Flora e Saulo, pela amizade e apoio.

Ao Professor Rubens Onofre Nodari, pela confiança, pela coorientação e pela oportunidade do intercâmbio no GenØk.

Ao Professor Afonso Inácio Orth, pela orientação.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para avaliar e contribuir para este estudo.

A Fern Wickson, Marek Cuhra e Thomas Bøhn, pelo companheirismo, apoio constante, colaboração e ricas discussões. Tusen takk!

Aos demais colegas do GenOk – Centre for Biosafety, Noruega, pela receptividade, colaboração e amizade.

Aos meus colegas de pós-graduação, pela amizade e cooperação; por cada momento de fraternidade e descoberta.

Ao pessoal do LFDGV, pela colaboração, amizade e conversas, sérias e descontraídas. Sucesso total!

Aos Professores do RGV, pela troca de idéias e difusão do conhecimento. Pelo estímulo à reflexão genuína.

Ao Fredskorpset (FK Norway), pelo apoio financeiro e preparação durante um intercâmbio entre o CCA/UFSC (Brasil) e o GenØk (Noruega), e à CAPES pela bolsa de Mestrado.

À Taciane Finatto, pelo companheirismo e pela colaboração. Por tudo o que compartilhamos e pelas coisas que me mostrou.

À Denise Olkoski, pelo companheirismo, pela cooperação, pelos momentos que passamos juntos e pelo que tem me ensinado.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e para meu auto-aprimoramento.

A Deus, mais uma vez, mas não a última.

A incerteza pode ser uma luz-guia.
(Paul Hewson, 1993)

RESUMO

O cultivo de milho e o manejo de pragas associado têm grande impacto ecológico, e detritos pós-colheita constituem importante fonte de nutrientes em ecossistemas límnicos. O presente trabalho objetivou comparar os efeitos de uma variedade de milho transgênico (evento MON810) e sua linha isogênica na sobrevivência, crescimento e diversos parâmetros reprodutivos do organismo aquático não-alvo *Daphnia magna*, durante um experimento crônico de alimentação em laboratório utilizando folhas de milho. Detectou-se por *immunoblotting* a banda imunorreativa esperada do núcleo ativo de Cry1Ab truncada (69 kDa) e uma banda adicional inesperada de 35 kDa nas folhas de milho transgênico utilizadas no experimento. *Daphnia magna* alimentada com folhas de milho-Bt mostrou uma redução significativa em tamanho corporal e fecundidade em estádios tardios da vida, mas a sobrevivência não foi afetada. Adicionalmente, *D. magna* alimentada com folhas de milho-Bt produziram um maior número de ovos de dormência, uma resposta a condições estressantes. As diferenças observadas podem ter sido causadas por maiores custos metabólicos relacionados a uma pior qualidade nutricional do milho-Bt (efeitos pleiotrópicos derivados da transformação genética) e/ou a um efeito tóxico de Cry1Ab, que induziram em *D. magna* uma realocação de recursos para maior produção de ovos de dormência e fecundidade precoce, subsequente acarreando uma redução no crescimento somático e na reprodução. O presente estudo provê evidências de efeitos crônicos adversos de milho-Bt (MON810), e corrobora estudos anteriores que identificaram riscos de milho-Bt para organismos não-alvo e para o ambiente.

Palavras chave: Avaliação de risco. Cry1Ab. Efeitos não intencionais. Evento MON810. Milho-Bt. Organismo geneticamente modificado. Organismo modelo. Organismo não-alvo. Pleiotropia. Transformação genética. Teste crônico.

ABSTRACT

Maize cultivation and associated pest management have great ecological impact and post-harvest detritus is a main source of organic nutrient income in freshwater ecosystems. The present study aimed to compare the effects of a transgenic maize variety (event MON810) and its isogenic line on survival, growth and several reproductive parameters in the aquatic non-target organism *Daphnia magna*, during a 42-day chronic laboratory feeding experiment using maize leaves. We detected the expected 69 kDa Cry1Ab immunoreactive band and an additional 35 kDa band in the transgenic maize material used for feed production. We found a significant reduction in body size and fecundity later in the lifespan of *D. magna* fed Bt-maize leaves, but survival was not affected. Additionally, Bt-maize fed *D. magna* produced a greater number of resting eggs, a response to stressful conditions. The observed effects may have been caused by greater metabolic costs related to a poorer nutritional quality of Bt-maize (pleiotropic effects derived from the genetic transformation) and/or a mild toxic effect of Cry1Ab, which induced a trade-off to allocate resources for production of resting eggs and early-life fecundity, subsequently causing a reduction in somatic growth and reproduction. The present study provides new evidence of chronic adverse effects of MON810 Bt-maize, and supports conclusions of studies that identified risks of transgenic Bt-maize to non-target organisms and the environment.

Keywords: Bt-maize. Chronic test. Cry1Ab. Event MON810. Genetically modified organism. Genetic transformation. Model organism. Non-target organism. Pleiotropy. Risk assessment. Unintentional effects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Milho Bt no campo: possíveis interações com sistemas aquáticos. Adaptado de Tank <i>et al.</i> (2010). Milho Bt: milho geneticamente transformado pela inserção de genes <i>cry</i> da bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> , tornando-o tóxico para alguns insetos-praga. Cry1Ab: proteína recombinante produzida por variedades de milho contendo o transgene <i>cry1ab</i>	34
Figura 2 - Ciclo de vida de espécies do gênero <i>Daphnia</i> . Adaptado de Dita B. Vizoso, em Ebert (2005).	38
Figura 3 - Indivíduo típico de 27 dias de idade alimentado com <i>Scenedesmus dimorphus</i> (a); indivíduo típico de 27 dias de idade alimentado com folhas de milho (b); juvenis saudáveis (setas com linha inteira) e abortos (setas com linha tracejada) (c). Barras de escala têm 2 mm. Fotos: Daniel Ferreira Holderbaum, Tromsø, 2011.	48
Figura 4 - <i>Immunoblotting</i> mostrando a presença de bandas esperadas para Cry1Ab truncado (~ 69 kDa) e de bandas não esperadas (~ 35 kDa) em três plantas (GM1, GM2 e GM3) de milho Bt (MON810), e ausência das bandas em três plantas da isolinha (Iso1, Iso2 e Iso3).	52
Figura 5 - Curva padrão da absorbância (492 nm) em função da concentração do padrão de Cry1Ab, e a respectiva equação da regressão cúbica utilizada para estimação da concentração de Cry1Ab nas folhas de milho em ensaio de ELISA. ABS (est.): absorbância estimada. ABS (obs.): absorbância observada.	53
Figura 6 - Concentração média de Cry1Ab nas partículas de folhas de milho Bt (MON810) presentes nas soluções de alimentação. Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=3).	54
Figura 7 - Curvas de sobrevivência para animais alimentados com folhas de milho isogênico (linha sólida) e milho Bt (linha tracejada). Linhas fracas indicam bandas de confiança a 95% de probabilidade (n=90).	56
Figura 8 - Tamanho médio de matrizes de <i>D. magna</i> alimentadas com folhas de milho Bt e milho isogênico, ao longo do tempo. Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=90). <i>P</i> indica o P-valor obtido no contraste.	60
Figura 9 - Curvas de incidência cumulativa da maturidade sexual para animais alimentados com folhas da variedade isogênica (linha sólida) e de milho Bt (linha tracejada). Linhas fracas indicam bandas de confiança a 95% de probabilidade (n = 90; n° de eventos: Isolinha = 81, Milho Bt = 80; censurados (devido à mortalidade): Isolinha = 9, Milho Bt = 10).	61
Figura 10 - Curvas de incidência cumulativa da primeira reprodução em animais alimentados com folhas de milho isogênico (linha sólida) e milho Bt (linha tracejada). Linhas fracas indicam bandas de confiança a 95% de probabilidade (n = 90; n° de eventos: Isolinha = 74, Milho Bt = 77; censurados (devido à mortalidade): Isolinha = 16, Milho Bt = 13).	62
Figura 11 - Fecundidade (juvenis acumulados) média de matrizes de <i>D. magna</i> alimentadas com folhas de milho Bt e milho isogênico, ao longo do tempo.	

Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=90). <i>P</i> indica o P-valor obtido no contraste.....	66
Figura 12 - Percentagem de abortos acumulada ((acúmulo de abortos/total de juvenis)*100) média de matrizes de <i>D. magna</i> alimentadas com folhas de milho Bt e milho isogênico, ao longo do tempo. Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=90). <i>P</i> indica o P-valor obtido no contraste.....	69
Figura 13 - Número total de <i>ephippia</i> produzidas por <i>D. magna</i> sob dietas de folhas de milho transgênico e da isolinha, ao longo de 42 dias. N=90.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para concentração de Cry1Ab obtida em ensaio de ELISA em folhas de diferentes plantas de milho transgênico (MON810).	53
Tabela 2 - Médias \pm desvio padrão dos parâmetros físico-químicos pH, condutividade elétrica (μ S) e oxigênio dissolvido (O ₂ (%)) em meio de Elendt fresco (imediatamente antes da transferência dos animais) e usado (3 dias após a transferência dos animais), para o controle interno (dieta de alga) e para os tratamentos Isolinha e Milho Bt.....	55
Tabela 3 - Comparações entre estruturas de matriz de covariância para seleção do modelo de melhor ajuste para análise da variável tamanho. O menor valor de BIC (melhor ajuste) está em negrito.	58
Tabela 4 - Tabela da análise de modelo misto para a variável tamanho de matrizes alimentadas com folhas de milho Bt ou milho isolinha (fator variedade) ao longo do tempo (fator tempo).	59
Tabela 5 - Tabela de contingência para a variável número de fêmeas reprodutivas de <i>D. magna</i> sob dietas de folhas de milho Bt e da variedade isogênica.	61
Tabela 6 - Comparações entre estruturas de matriz de covariância para seleção do modelo de melhor ajuste para análise da variável fecundidade. O menor valor de QIC (melhor ajuste) está em negrito.	63
Tabela 7 - Tabela de análise de GEE para a variável fecundidade de matrizes alimentadas com folhas de milho Bt ou milho isolinha (fator variedade) ao longo do tempo (fator tempo).	64
Tabela 8 - Comparações entre estruturas de matriz de covariância para seleção do modelo de melhor ajuste para análise da variável Percentagem de abortos. O menor valor de QIC (melhor ajuste) está em negrito.	67
Tabela 9 - Tabela de análise de GEE para a variável Percentagem de Abortos em matrizes alimentadas com folhas de milho Bt ou milho isolinha (fator variedade) ao longo do tempo (fator tempo).	67
Tabela 10 - Tabela de contingência para a variável produção de <i>ephippium</i> em fêmeas de <i>D. magna</i> sob dietas à base folhas de milho Bt e da variedade isogênica.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS - Albumina bovina sérica
ANOVA - Análise de variância
ARA - Avaliação de risco ambiental
BIC - *Schwartz Bayesian Information Criterion*
Bt - *Bacillus thuringiensis*
CERA - *Center for Environmental Risk Assessment*
CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DAS-ELISA - *Double Antibody Sandwich - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*
DTT - 1,4-Dithiothreitol
FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
GEE - *Generalized Estimating Equations*
GL - Grau de liberdade
GM(s) - Geneticamente modificado(s)
HT - *Herbicide tolerant*
ICP(s) - *Insecticidal crystal protein(s)*
ISO - *International Standardization Organization*
kDa - kilo Dalton
OECD - *Organization for Economic Co-operation and Development*
OGM(s) - Organismo(s) geneticamente modificado(s)
OMS - Organização Mundial da Saúde
ONA(s) - Organismo(s) não-alvo
PBST - *Phosphate buffered saline - Tween*
QIC - *Quasi-likelihood under the independence model criterion*
SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
UNCED - *United Nations Conference on Environment and Development*
US EPA - *United States Environment Protection Agency*
UV-Vis - Ultravioleta-Visível
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 AGRICULTURA, SEGURANÇA ALIMENTAR E PLANTAS GM NO MUNDO	27
2.2 EQUIVALÊNCIA SUBSTANCIAL E AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL	28
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> E TOXINAS CRY	30
2.4 MILHO BT.....	31
2.5 PLANTAS BT NO AMBIENTE	33
2.6 EFEITOS OBSERVADOS DE MILHO BT EM ORGANISMOS NÃO-ALVO.....	34
2.7 ORGANISMOS MODELO	35
2.8 O GÊNERO <i>Daphnia</i>	36
2.9 <i>Daphnia magna</i> STRAUSS.....	38
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL	43
4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL...	43
4.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	43
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE CRY1AB POR IMMUNOBLOTTING	44
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE Cry1Ab POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSSORBENT ASSAY)	44
4.6 MANUTENÇÃO DE POPULAÇÕES DE <i>Daphnia magna</i>	45
4.7 TESTE CRÔNICO COM <i>Daphnia magna</i> STRAUSS.....	46
4.8 ANÁLISE DOS DADOS	49

4.8.1 Quantificação de Cry1Ab por ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunossorbent Assay</i>)	49
4.8.2 Teste crônico com <i>Daphnia magna</i> Strauss.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE Cry1Ab	51
5.2 TESTE CRÔNICO COM <i>Daphnia magna</i> STRAUSS	54
5.2.1 Temperatura e parâmetros físico-químicos do meio de cultivo	54
5.2.2 Resposta de <i>Daphnia magna</i> no controle interno (dieta de alga)	55
5.2.3 Sobrevivência.....	56
5.2.4 Tamanho corporal.....	57
5.2.5 Proporção de indivíduos reprodutivos.....	60
5.2.6 Tempo até a maturidade sexual e até a primeira reprodução	61
5.2.7 Fecundidade.....	63
5.2.8 Percentagem de Abortos.....	66
5.2.9 Produção de <i>Ephippia</i>	69
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser definidos como organismos nos quais o material genético (DNA) foi alterado através de técnicas usualmente denominadas de “biotecnologia moderna”, “engenharia genética” ou “tecnologia do DNA recombinante” (Brasil, 2005). Estas técnicas possibilitam que genes individuais selecionados sejam transferidos de um organismo para outro, inclusive entre espécies não relacionadas, permitindo que o receptor expresse traços ou características normalmente associadas somente ao doador. Tais métodos são empregados na obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) desde a década de 1980 (Pretty, 2001; OMS, 2010).

A regulamentação da engenharia genética varia em nível internacional. Entretanto, algumas recomendações são relativamente comuns (Schauzu, 2000; Holst-Jensen, 2009): avaliações caso-a-caso com foco em segurança, a distinção entre uso contido e liberação no ambiente, a distinção entre cultivo e uso, e o emprego, como base para a avaliação de um OGM, do conceito de equivalência substancial:

Para alimentos e componentes alimentícios oriundos de organismos desenvolvidos pela aplicação da biotecnologia moderna, a abordagem mais prática para determinação da segurança é verificar se eles são substancialmente equivalentes a produto(s) alimentícios análogos, se estes existem... o conceito de equivalência substancial incorpora a ideia de que organismos existentes utilizados como alimento, ou como fontes de alimento, podem ser utilizados como base de comparação ao se avaliar a segurança para a saúde humana de um alimento ou componente alimentício novo ou que foi modificado (OECD, 1993).

A despeito de sua larga adoção (ou justamente devido a isto), a validade e efetividade do conceito de equivalência substancial para a avaliação da segurança de um OGM têm sido duramente contestadas por diferentes autores (Millstone *et al.*, 1999; Bøhn *et al.*, 2010; Séralini *et al.*, 2011).

O milho GM é o segundo maior cultivo GM em área plantada no mundo, com 50,0 milhões de hectares (34% da área mundial com

cultivos GM) (James, 2011). No Brasil o plantio e comercialização do milho GM YieldGardTM (evento MON810), que contém gene de *Bacillus thuringiensis* (Bt), foram autorizados em 2008 pelo Parecer Técnico N° 1.100/07, emitido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (Brasil, 2008). Ao lado do evento NK603 (milho tolerante a herbicidas (HT)), o evento de transformação MON810 é o evento com o segundo maior número de aprovações no mundo (20 países), atrás do evento GTS-40-3-2 (soja HT) (James, 2011).

O cultivo de milho e as práticas de manejo de pragas associadas detêm um grande impacto nos recursos biológicos em uma dada região (Ferré, 2002). Considerando que a proteção e a conservação da biodiversidade são objetivos da humanidade (UNCED, 1992), acordos internacionais como a Convenção da Biodiversidade e o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança preconizam a adoção do Princípio da Precaução – uma das principais ferramentas regulatórias das políticas ambientais e de saúde, cuja definição mais utilizada é:

Com o fim de proteger o meio ambiente, o princípio da precaução deverá ser amplamente observado pelos Estados, de acordo com suas capacidades. Quando houver ameaça de danos graves ou irreversíveis, a ausência de certeza científica absoluta não será utilizada como razão para o adiamento de medidas economicamente viáveis para prevenir a degradação ambiental (UNCED, 1992).

Nos últimos 40 anos a aplicação de novas tecnologias aumentou significativamente a produção agrícola, mas também mostrou relevantes efeitos adversos no ambiente (Tilman *et al.*, 2001; Matson *et al.*, 1997). Apesar da recente introdução dos cultivos GM, dentre seus efeitos em agroecossistemas já foram observados: o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes ao glifosato (ingrediente ativo do RoundUp®, herbicida comercializado em pacote com muitas plantas HT (Powles, 2008)); desenvolvimento de resistência de pragas-alvo a cultivos Bt (Kruger *et al.*, 2009); substituição de pragas-chave por pragas secundárias (Lu *et al.*, 2010); e efeitos de plantas GM ou tecnologias associadas em organismos não-alvo (ONAs) (Rosi-Marshall *et al.*, 2007; Bøhn *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009; Paganelli *et al.*, 2010). Tais características colocam em cheque a sustentabilidade ecológica destes sistemas, especialmente se comparados a práticas agrícolas como

agricultura orgânica e agroecologia (Matson *et al.*, 1997; Tilman, 1999; Pretty, 2001; Badgley *et al.*, 2007; Uphoff, 2007; Heinemann, 2009).

Com base no exposto, argumenta-se que análises toxicológicas adequadas para testar plantas GM são importantes componentes iniciais em avaliações de risco ambiental, contribuindo para um melhor entendimento das possíveis interações ecológicas destes novos organismos. Por meio de comparações entre plantas GM e a contraparte adequada, este tipo de análise possibilita o isolamento de efeitos e a avaliação da qualidade do material vegetal como um todo, provendo resultados dificilmente obtidos sob a ótica da “equivalência substancial”.

Daphnia magna é um crustáceo generalista largamente utilizado como organismo modelo em testes agudos e crônicos (de curto e longo prazo, respectivamente) para a determinação de toxidez de substâncias (ISO, 1982; 2000; OECD, 2004; 2008). Visando à avaliação da qualidade do material vegetal como um todo (folhas, especificamente), dietas exclusivas de folhas de milho trituradas foram preparadas e ofertadas aos animais, em quantidades controladas que provessessem energia suficiente para manutenção, crescimento e reprodução, conforme observado em experimentos preliminares. Optou-se por utilizar folhas porque detritos vegetais oriundos de lavouras constituem uma importante fonte de entrada de nutrientes orgânicos em ambientes aquáticos (Poté *et al.*, 2009), com a energia presente nesta fonte de carbono abastecendo teias alimentares aquáticas (Tank *et al.*, 2010). Além disso, Bøhn *et al.* (2008; 2010) encontraram efeitos adversos em *D. magna* exposta a grãos triturados de milho Bt em comparação à linha isogênica e, de acordo com a literatura consultada, folhas de plantas transgênicas ainda não haviam sido utilizadas em avaliações de segurança com *D. magna*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGRICULTURA, SEGURANÇA ALIMENTAR E PLANTAS GM NO MUNDO

Desde o advento dos primeiros cultivos comerciais GM em 1996, sua área plantada aumentou 94 vezes, atingindo 160 milhões de hectares cultivados em 2011, distribuídos em 29 países, incluindo 19 nações em desenvolvimento e 10 nações desenvolvidas (James, 2011). Um dos principais argumentos utilizados para a promoção do cultivo de plantas GM se baseia na necessidade de aumentar a produção de alimentos em ao menos 70% de forma sustentável até 2050, utilizando aproximadamente a mesma área de terras aráveis (o Brasil é uma exceção) e menos recursos. Argumenta-se ainda quanto à necessidade urgente de aliviar a pobreza e a fome que estão afligindo mais de um bilhão de pessoas no mundo (James, 2011). Considerando que de 1996 a 2009 o número absoluto de pessoas famintas ou subnutridas no mundo vem aumentando significativamente, enquanto a produção de alimentos é de fato suficiente para prover uma dieta adequada para todos os seres humanos (FAO, 1996; 2009), fica claro que o problema da insegurança alimentar não possui solução simples ou única, e tampouco que a agricultura sozinha possa trazer esta solução.

Recentemente, a FAO (2009) estimou a existência de 1,02 bilhões de pessoas subnutridas no mundo, um aumento considerável comparado à estimativa de 2006, de 854 milhões de pessoas. Isto representa mais pessoas famintas do que em qualquer época desde 1970. O aumento da insegurança alimentar não é um resultado de colheitas pouco produtivas, mas do alto preço dos alimentos, baixa renda e desemprego crescente, que reduziram o acesso à comida pelos pobres (FAO, 2009). O fato de a fome estar em crescimento desde antes da crise econômica de 2008 sugere que as estratégias atuais são insuficientes e inadequadas para enfrentar o problema (FAO, 2009). Para acabar com a fome, as pessoas que dela padecem necessitam de controle sobre recursos, acesso a oportunidades, e melhorias na governança em níveis internacional, nacional e local (FAO, 2009).

Neste mesmo contexto, argumenta-se que sistemas agrícolas dominados por plantas GM são menos nocivos à biodiversidade e possibilitam ganhos em produtividade (James, 2011). No entanto, as conclusões dos ganhos atribuídos às lavouras GM são derivadas de comparações a métodos convencionais notoriamente nocivos, ao invés de aos sistemas agrícolas baseados no controle integrado de pragas e em

métodos agroecológicos (Heinemann, 2009). Práticas agrícolas modernas têm sido amplamente relacionadas a declínios na biodiversidade de agroecossistemas, abrangendo uma ampla gama de grupos taxonômicos, regiões geográficas e escalas espaciais (Ammann, 2005). “Transformar os sistemas agrícolas pela introdução de tecnologias que integram processos agroecológicos na produção de alimentos, enquanto minimizam-se efeitos adversos no ambiente, é um ponto chave para a agricultura sustentável” (OMS, 2005).

Não obstante, é óbvio que abordagens agroecológicas para o desenvolvimento agrícola não negam o valor do melhoramento genético convencional ou mesmo da transgenia (Uphoff, 2007). Inovações transgênicas podem produzir benefícios, e podem de fato ser valiosas na resolução de certos problemas de produção e proteção de cultivos (Uphoff, 2007). Entretanto, existem preocupações quanto ao modo como grande parte das pesquisas em transgenia são conduzidas, dirigidas principalmente por investimentos e incentivos privados, que não necessariamente têm em conta os interesses públicos e ambientais de modo sistemático e transparente (Herring, 2007; Uphoff, 2007). Além disso, existem dúvidas quanto à verdadeira relação custo-benefício de tais inovações, incluindo custos com regulamentação e monitoramento (Herring, 2007; Uphoff, 2007), assim como incertezas quanto aos possíveis riscos ambientais e para a saúde humana e animal, e os reais efeitos sociais e econômicos (Pretty, 2001). Em contrapartida, alternativas como o melhoramento genético convencional, visando, por exemplo, o incremento de produtividade em solos de baixa fertilidade, foram pouco exploradas e recebem poucos recursos, mas podem melhorar significativamente a produtividade e sustentabilidade de agroecossistemas com menos insumos externos (Lynch, 2007).

2.2 EQUIVALÊNCIA SUBSTANCIAL E AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL

A abordagem comumente empregada como base para a regulamentação de plantas GM envolve o conceito de equivalência substancial. Em geral o processo envolve uma análise composicional (perfil de alguns nutrientes e substâncias tóxicas), a ingestão esperada e o papel do novo alimento na dieta. Esta comparação dispõe a base a partir da qual serão focadas exigências toxicológicas para as avaliações de risco (Cellini *et al.*, 2004).

O conceito de “equivalência substancial” foi introduzido em 1993 pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento

(*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD)) sendo posteriormente aprovado em 1996 pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO/OMS) (FAO/OMS, 1995).

Para os críticos do conceito de equivalência substancial, este nunca foi adequadamente definido: o grau de diferença entre um alimento natural e sua alternativa GM necessário para a “substância” deixar de ser aceitavelmente “equivalente” não está definido em lugar algum, e tampouco uma definição exata foi acordada por legisladores (Millstone *et al.*, 1999). Ainda segundo Millstone *et al.* (1999), a equivalência substancial é um conceito inerentemente anti-científico por ter sido criado essencialmente para fornecer um pretexto para que testes bioquímicos e toxicológicos necessários não sejam realizados, enquanto muitas das relações entre genética, composição química e riscos toxicológicos, aliados à possibilidade do surgimento de efeitos indesejados/inesperados decorrentes da transformação genética, permanecem desconhecidas. Possíveis efeitos inesperados estariam relacionados a um desbalanceamento metabólico provocado na planta devido à inserção do(s) transgene(s), efeitos estes que podem não ser visíveis através de uma análise composicional detalhada em um estudo de equivalência substancial (Séralini *et al.*, 2011).

O potencial de ocorrência de “efeitos indesejados” é atualmente uma das principais preocupações levantadas com relação à aplicação de técnicas de DNA recombinante na produção de alimentos (Cellini *et al.*, 2004). A inserção aleatória de sequências de DNA específicas em um genoma (efeito intencional) pode causar rupturas, modificações ou silenciamento de genes ativos ou a ativação de genes inativos, o que pode levar à formação de novos metabólitos ou alteração nos níveis de tradução de metabólitos já existentes (Kuiper *et al.*, 2001). Efeitos não intencionais previsíveis e imprevisíveis podem ou não deter relevância em termos da segurança do produto, mas devem ser levados em conta em uma avaliação de risco (Cellini *et al.*, 2004).

Comumente a estratégia de avaliação de risco ambiental (ARA) para plantas GM procura lançar mão de métodos e abordagens para comparar plantas GM e seus derivados com suas contrapartes não-GM (Bartsch *et al.*, 2010). Em cultivos propagados vegetativamente, análises comparativas incluem a variedade parental utilizada na produção das linhas GM, enquanto em cultivos reproduzidos sexualmente, os comparadores convencionais apropriados são as linhas isogênicas (Cellini *et al.*, 2004). Linhas isogênicas são duas ou mais linhas que compartilham a mesma constituição genética, exceto para alelos em um

ou poucos *loci* (Briggs & Knowles, 1967). Portanto, distinguem-se de clones, linhas homozigotas, gêmeos idênticos, etc., que são idênticos em todos os *loci* (Allard, 1960).

Em teoria, as ARAs deveriam considerar efeitos não-intencionais na aptidão da planta, consequências da transformação genética, desenvolvimento de resistência em organismos-alvo, efeitos adversos em organismos não-alvo (ONA), efeitos na saúde humana e animal de indivíduos expostos a plantas GM, efeitos devido a mudanças no cultivo e manejo das lavouras e potenciais impactos em ciclos biogeoquímicos e no ambiente abiótico (Bartsch *et al.*, 2010). Após serem realizadas as avaliações de risco, a gestão de risco tem como objetivo implementar políticas públicas adequadas aos resultados obtidos na avaliação de riscos, quer sejam riscos para a saúde humana e animal, para o ambiente, ou riscos socioeconômicos como o aumento de dependência dos agricultores em relação a pacotes tecnológicos e à cobrança de *royalties* ou à perda de renda de lavouras menos produtivas (Ferment *et al.*, 2009).

2.3 *Bacillus thuringiensis* E TOXINAS CRY

Há uma longa história de uso de *B. thuringiensis* na proteção de plantas contra insetos-praga e vetores de doenças. As propriedades inseticidas desta bactéria se devem à presença de um cristal para-esporal produzido no momento da esporulação, que é composto pelas chamadas “proteínas cristalinas” (“proteínas cry”) ou “proteínas cristalinas inseticidas” (ICPs da sigla em inglês *insecticidal crystal proteins*). No cristal, estas proteínas estão na forma de pró-toxina que, em condições específicas e sob digestão parcial por proteases no trato intestinal dos insetos alvo, é convertida na forma ativa (referida como “toxina cry” ou “toxina *Bt*”). As proteínas cry são codificadas pelos genes *cry*, que geralmente são carregados por plasmídeos de grande tamanho, embora em alguns casos genes *cry* tenham sido encontrados no DNA cromossômico de *B. thuringiensis* (Ferré, 2002).

A ocorrência de *B. thuringiensis* foi reportada em amostras de diversos ambientes, especialmente aqueles ricos em insetos, tais como armazéns de grãos e produtos, diferentes compostos orgânicos e solos, o filoplano de diferentes plantas, cadáveres de insetos, e fezes de vertebrados herbívoros, bem como em ambientes aquáticos (Bernhard *et al.*, 1997; Martínez & Caballero, 2002; Hilbeck & Schmidt, 2006).

Existem dezenas de milhares de cepas de *B. thuringiensis*, mantidas em coleções públicas ou privadas. Estas cepas são

classificadas dentro de serovariedades de acordo com seus antígenos flagelares (exemplos de serovariedades são *kurstaki*, *aizawai*, *israelensis*, etc.) (Ferré, 2002). Cepas pertencentes a uma mesma serovariedade normalmente diferem em seu conteúdo de genes *cry* e, portanto, em seu espectro de atividade contra insetos (Ferré, 2002).

Preparações comerciais de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas normalmente como uma mistura de células bacterianas, esporos e pró-toxinas inativas (Höfte & Whiteley, 1989). O controle biológico de pragas invertebradas com δ -endotoxinas (toxinas *cry*) de *B. thuringiensis* representa um dos mais bem sucedidos usos de um agente de controle biológico, e é uma alternativa notável ao uso de inseticidas quimicamente sintetizados (Luthe *et al.*, 1982; Entwistle *et al.*, 1993; Crecchio & Stotzky, 1998). A vantagem mais frequentemente citada do uso de *B. thuringiensis* para o controle de pragas é sua presumida especificidade contra certas espécies de insetos, as chamadas espécies alvo, enquanto todos os outros organismos, denominados “espécies não-alvo”, não são afetados (Hilbeck & Schmidt, 2006). Considera-se que a especificidade das toxinas *cry* se deve à existência de receptores toxina-específicos localizados nas células do epitélio e ao alto pH do intestino de espécies alvo (Höfte & Whiteley, 1989).

Estudos sobre efeitos não-alvo de *sprays* de formulações de *B. thuringiensis* mostraram resultados contraditórios, com ausências de efeitos em alguns casos e efeitos letais ou subletais em outros (Hilbeck & Schmidt, 2006). Muitos dos efeitos de *sprays* de formulações de *B. thuringiensis* foram atribuídos à presença de β -exotoxinas, conhecidas por serem menos específicas do que δ -endotoxinas, mas esta hipótese não foi completamente explorada (Hilbeck & Schmidt, 2006). O conhecimento da toxicidade aguda de β -exotoxinas em ONAs levou à proibição de formulações contendo estas toxinas (Lacey & Siegel, 2000; Hilbeck & Schmidt, 2006).

Apesar do número considerável de estudos que reportam efeitos adversos em invertebrados não-alvo, presume-se que formulações de *B. thuringiensis* baseadas em δ -endotoxinas são altamente específicas e detém efeitos insignificantes em ONAs devido a sua bioatividade limitada sob condições de campo (Ignoffo & Garcia, 1978; Hilbeck & Schmidt, 2006).

2.4 MILHO BT

Os genes de *B. thuringiensis* que codificam proteínas inseticidas (genes *cry* ou genes *Bt*) foram transferidos para espécies de importância

agronômica (tais como milho e algodão) e isto conferiu a estes cultivos (cultivos Bt) resistência a importantes insetos-praga (Ferré, 2002), efetivamente tornando-as plantas inseticidas. A maioria dos eventos de milho GM para resistência a insetos atualmente cultivados contém o gene *cry1Ab* (CERA, 2010). Variedades de milho GM que contém estes eventos (eventos genéticos SYN-EV176-9, SYN-BT011-1, MON 810) produzem uma versão truncada da proteína Cry1Ab, expressa na forma ativa, sendo altamente tóxica para insetos lepidópteros alvo (Székács *et al.*, 2010). O constructo inserido no milho MON810 YieldGard™, produzido pela Monsanto, contém o promotor CaMV 35S, o íntron hsp70, o gene *cry1Ab* para resistência a lepidópteros e o terminador NOS, que de fato foi perdido em um evento de truncagem no sentido 3' do gene *cry1Ab* (Rosati *et al.*, 2008).

Uma das razões para o interesse em plantas Bt é que se supõe que elas sejam inofensivas para insetos benéficos, incluindo predadores e parasitoides, bem como para outras espécies não-alvo, considerando o modo de ação comumente aceito das toxinas bacterianas Bt (Shelton *et al.*, 2002; Hilbeck & Schmidt, 2006). Outros benefícios alegados para plantas Bt são: menor esforço necessário para o monitoramento de pestes-alvo (Obrycki *et al.*, 2001), redução da aplicação de inseticidas de amplo-espectro, e colheitas maiores devido ao controle de importantes pragas ao longo de todo o cultivo. No entanto, plantas Bt são diferentes de formulações convencionais de *B. thuringiensis*, na medida em que as toxinas cry de origem bacteriana persistem por um curto tempo sobre a superfície de plantas após a sua aplicação, enquanto plantas Bt expressam as toxinas ao longo de todo o seu desenvolvimento (Hilbeck & Schmidt, 2006). Além disso, plantas Bt expressam toxinas cry em uma forma ativada (69 kDa para Cry1Ab), diferente das pró-toxinas produzidas por *B. thuringiensis*, que necessitam ser ativadas mediante condições específicas no trato gastrointestinal de insetos alvo, em um processo no qual o peso molecular das proteínas é reduzido por meio da ação de proteases específicas, p.e. de 130-140 kDa para 60-65 kDa para toxinas Cry1 (Hilbeck & Schmidt, 2006).

Cultivares de milho contendo o evento MON810 produzem Cry1Ab de maneira tecido- e tempo-específica (Abel & Adamczyk, 2004; Nguyen & Jehle, 2007; Székács, 2010). A qualidade do solo, especialmente o teor de nitrogênio, detém forte influência na expressão da toxina Cry1Ab em milhos GM (Bruns & Abel, 2003; Székács *et al.*, 2010). Toxinas Cry1 são diferencialmente expressas entre plantas individuais de uma mesma variedade de milho GM (Nguyen & Jehle, 2007; Székács *et al.*, 2010), tecidos de uma mesma planta, estádios de

desenvolvimento (Nguyen & Jehle, 2007), entre folhas de uma mesma planta e longitudinalmente numa mesma folha (Székács *et al.*, 2010).

2.5 PLANTAS BT NO AMBIENTE

Devido às toxinas cry serem produzidas nos tecidos de plantas GM, elas são mais bem protegidas contra degradação ambiental. Insetos que se alimentam destas plantas são continuamente expostos às toxinas, e a seleção de insetos-alvo resistentes foi antecipada por diferentes autores (McGaughey, 1985; McGaughey & Whalon, 1992; Tabashnick, 1994), e posteriormente confirmada a campo (Kruger *et al.*, 2009). Além disso, apenas as porções utilizáveis de plantas são colhidas, e o restante da biomassa vegetal contendo as toxinas será mantido sobre ou incorporado no solo. Assim, em cultivos Bt as toxinas estão presentes por mais tempo e em maiores concentrações do que toxinas introduzidas através de formulações comerciais de *B. thuringiensis*. Estas concentrações podem exceder o consumo por larvas de insetos-alvo e a inativação e degradação pela microbiota do solo, constituindo um possível risco para ONAs (Flexner *et al.*, 1986; Goldburg & Tjaden, 1990; Bøhn *et al.*, 2008, 2010), especialmente quando os genes inseridos são modificados (ex. truncados) para codificar apenas para a síntese de toxinas ativas ao invés de para as pró-toxinas não-tóxicas a ONAs (Van Rie *et al.*, 1990).

Existem indicações de que as toxinas cry introduzidas por plantas GM poderiam persistir, acumular, e manter sua atividade inseticida no solo como resultado da ligação com ácidos húmicos, assim como com partículas de argila, o que poderia impor um risco para ONAs e aumentar a seleção de espécies alvo resistentes à toxina (Crecchio & Stotzky, 1998).

Em ambientes aquáticos, detritos vegetais constituem uma das principais fontes de nutrientes orgânicos (Poté *et al.*, 2009). A prática agrícola de deixar os detritos pós-colheita no campo, muito comum, facilita o transporte de detritos para cursos d'água através do vento e do arraste no escoamento superficial sob precipitações intensas (Tank *et al.*, 2010). Uma vez que detritos de milho adentram em cursos d'água, possíveis destinos são degradação através da decomposição microbiana, consumo por invertebrados, sedimentação, ou transporte rio-abaixo (Rosi-Marshall *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2009; Chambers *et al.*, 2010; Swan *et al.*, 2009), com a energia presente nesta fonte de carbono abastecendo teias alimentares aquáticas (Tank *et al.*, 2010) (Figura 1).

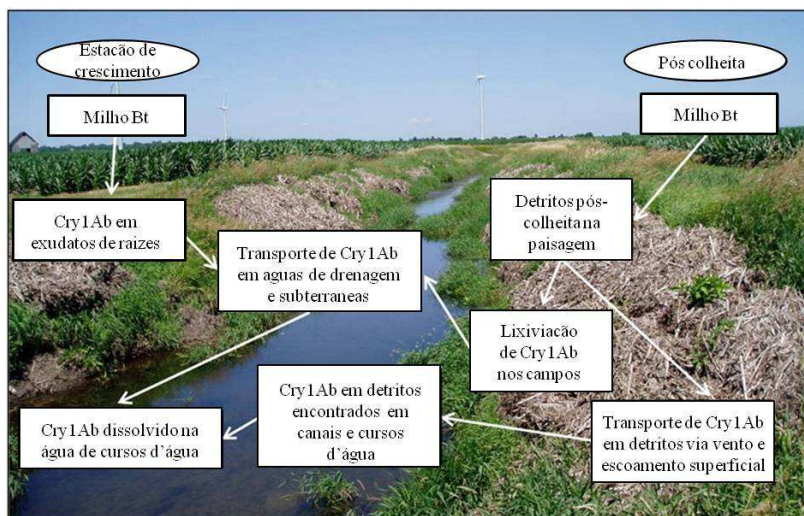


Figura 1 - Milho Bt no campo: possíveis interações com sistemas aquáticos. Adaptado de Tank *et al.* (2010). Milho Bt: milho geneticamente transformado pela inserção de genes *cry* da bactéria *Bacillus thuringiensis*, tornando-o tóxico para alguns insetos-praga. Cry1Ab: proteína recombinante produzida por variedades de milho contendo o transgene *cry1ab*.

2.6 EFEITOS OBSERVADOS DE MILHO BT EM ORGANISMOS NÃO-ALVO

Resultados de uma meta-análise de 42 experimentos de campo independentes, realizados em diferentes continentes (Marvier *et al.*, 2007) indicaram que invertebrados não-alvo são geralmente mais abundantes em campos de variedades isogênicas, onde não foram aplicados tratamentos inseticidas, do que em campos cultivados com algodão ou milho expressando genes *cry1* (eventos MON810, Bt176, MON863). Entretanto, quando campos de algodão ou milho não-Bt são manejados com a aplicação de inseticidas (cultivo convencional), *taxons* não-alvo são menos abundantes do que em campos cultivados com algodão ou milho Bt.

Dentre 54 estudos sobre efeitos de milho Bt em ONAs incluídos em uma revisão feita por Hilbeck e Schmidt (2006), 27 (50%) reportaram efeitos negativos em um ou mais dos parâmetros analisados. Diversas hipóteses foram sugeridas para explicar a ocorrência de efeitos adversos de plantas Bt em ONAs. Em alguns casos, os efeitos-não alvo

foram atribuídos à pleiotropia (fenômeno no qual um único loco afeta duas ou mais características fenotípicas aparentemente não-relacionadas (Stearns, 2010) em plantas Bt, em termos de expressão diferencial de metabólitos primários e secundários entre variedades Bt e suas contrapartes isogênicas (Ashouri *et al.*, 2001; Hilbeck & Schmidt, 2006).

Diferenças sutis não identificadas na estrutura das toxinas cry expressas por plantas Bt poderiam afetar a especificidade de ligação e de hospedeiros (Crickmore, 2005), e juntamente com a passagem pelo trato digestivo de insetos herbívoros poderiam explicar os efeitos adversos observados em ONAs (Hilbeck & Schmidt, 2006). Além disso, efeitos letais ou subletais em ONAs sob altas concentrações de toxina também poderiam ser desencadeados por outros mecanismos, mascarados em organismos alvo pelos efeitos letais induzidos através do modo de ação conhecido (Hilbeck & Schmidt, 2006).

Segundo Then (2010) diversos fatores extrínsecos e sinergismos podem influenciar a seletividade e efetividade de toxinas Bt. Estes fatores incluem outras toxinas Bt, bem como certas enzimas, estresses ambientais, micro-organismos não-patogênicos e doenças infecciosas. Isto é relevante para avaliações de risco de plantas Bt, ao se considerar o modo como toxinas Bt modificadas são expressas em plantas GM e efeitos inesperados em ONAs. Devido a isto, avaliações de risco de plantas GM deveriam questionar a suposição da alta seletividade e de uma relação de resposta linear dose-dependente para a toxicidade de proteínas Bt. Tanto seletividade quanto efetividade podem ser influenciadas por sinergismo, o que pode provocar efeitos inesperados e indesejados em ONAs (Then, 2010).

Dois estudos já identificaram riscos de milho Bt para *D. magna* exposta a grãos de milho transgênico e da variedade isogênica, detectando efeitos adversos relacionados ao valor adaptativo (*fitness*) deste organismo não alvo (Bøhn *et al.*, 2008; Bøhn *et al.*, 2010). Estes autores atribuíram os efeitos adversos observados a um efeito tóxico brando da toxina recombinante Cry1Ab, que teria causado uma realocação de recursos, refletida na antecipação da reprodução e posterior redução do tamanho, da sobrevivência e da fecundidade total de *D. magna* alimentada com milho Bt.

2.7 ORGANISMOS MODELO

Organismos modelo representam apenas uma pequena fração da biodiversidade da Terra, mas as pesquisas envolvendo tais organismos

representam o âmago do nosso conhecimento biológico, e sua utilização permitiu “*insights*” sobre princípios gerais que permeiam diversas disciplinas da biologia (Hedges, 2002).

Crustáceos cladóceros são invertebrados largamente utilizados em análises de qualidade ambiental e são organismos modelo comuns em toxicologia. Ensaio padrão com cladóceros de água doce são descritos em normas internacionais e utilizados rotineiramente para a determinação da toxidez de substâncias, tanto em testes agudos (curto prazo) quanto crônicos (longo prazo) (ISO, 1982; 2000; U.S. EPA 1993; OECD, 2004; 2008). Existem diversas vantagens no uso de cladóceros em testes de toxicidade, incluindo a facilidade de manejo em laboratório, obtenção de clones partenogenéticos, curto ciclo de vida e alta sensibilidade a substâncias tóxicas (Adema, 1978; Freitas & Rocha, 2009). Ainda assim, é recomendado o aperfeiçoamento do uso de organismos-teste e de protocolos para obter representatividade da sensibilidade de espécies locais ou condições sítio-específicas (Freitas & Rocha, 2009).

Experimentos toxicológicos baseados em laboratório são preventivos na medida em que facilitam a detecção de efeitos, enquanto experimentos a campo detém maior variabilidade e requerem maior número de replicatas para aumentar o poder estatístico (Duchet *et al.*, 2010). Portanto, embora ecologicamente relevantes, os estudos realizados a campo são propensos a maior erro experimental e podem levar a uma falta de significância estatística simplesmente como resultado do desenho experimental, e não da inocuidade da substância testada (Duchet *et al.*, 2010). Ainda assim, a situação ideal abrange a combinação de testes em condições de campo e laboratório, visando à aproximação de efeitos reais (Duchet *et al.*, 2010).

2.8 O GÊNERO *Daphnia*

O gênero *Daphnia* (Cladocera, Crustaceae) é um dos grupos mais amplamente conhecidos de zooplâncton de água doce (Benzie, 2005), que inclui crustáceos planctônicos pertencentes à ordem Phyllopoda (também chamada Branchiopoda) (Ebert, 2005). Espécies deste gênero são utilizadas como modelos fundamentais para o ensino de biologia (Benzie, 2005). O gênero, que inclui mais de 100 espécies, é mais diverso e abundante em regiões temperadas, mas é representado em todas as zonas climáticas, em todos os continentes, e é um dos membros dominantes entre zooplânctons de água doce no mundo (Benzie, 2005; Ebert, 2005).

As populações de espécies de *Daphnia* podem ser encontradas em uma variedade de corpos de água doce, desde enormes lagos a poças temporárias muito pequenas e piscinas sazonais. As espécies de *Daphnia* alimentam-se predominantemente filtrando partículas em suspensão (variando em tamanho de 1 µm a 50 µm, embora partículas de até 70 µm possam ser encontradas no intestino de indivíduos grandes), e são comumente os zooplâncton predominantes em lagos e lagoas, formando parte essencial da teia alimentar (Ebert, 2005). As populações são frequentemente iniciadas por um número pequeno de indivíduos, o que pode resultar em diferenças morfológicas e genéticas entre locais, moduladas pelos padrões de acasalamento utilizados por diferentes espécies. Os sistemas de acasalamento variam de partenogênese cíclica (reprodução sexuada ocasional) à reprodução assexuada obrigatória. Em alguns casos ambos os tipos de reprodução podem ser encontrados em diferentes populações de uma única espécie (Benzie, 2005).

O ciclo de vida de *Daphnia* (Figura 2) durante a estação de crescimento é caracterizado pelo modo assexuado de reprodução (apomixia). Uma fêmea produz uma ninhada de ovos partenogenéticos após cada muda na fase adulta, se as condições de alimentação permitirem. Durante o ciclo partenogenético, as fêmeas produzem ovos diploides que desenvolvem-se em filhas. Uma mesma fêmea pode produzir assexuadamente ovos diploides que se desenvolvem em filhos, sendo a produção de machos induzida por fatores ambientais. Além disso, a mesma fêmea pode produzir ovos haplóides que (geralmente) requerem fertilização por machos. Ovos sexuais são encerrados em uma concha protetora (*ephippium*) e necessitam passar por diapausa para que ocorra a eclosão, sempre de uma prole feminina (Ebert, 2005). Tanto o sexo da progênie partenogenética quanto o surgimento de ovos haplóides são determinados em resposta a fatores relacionados à deterioração das condições ambientais. Exemplos incluem disponibilidade de alimento, o acúmulo de produtos metabólicos, fotoperíodo e temperatura (Kleiven *et al.*, 1992). Existem evidências também de influência materna através da transmissão de informações acerca da disponibilidade de alimentos e do fotoperíodo para a cria (Alekseev & Lampert, 2001).

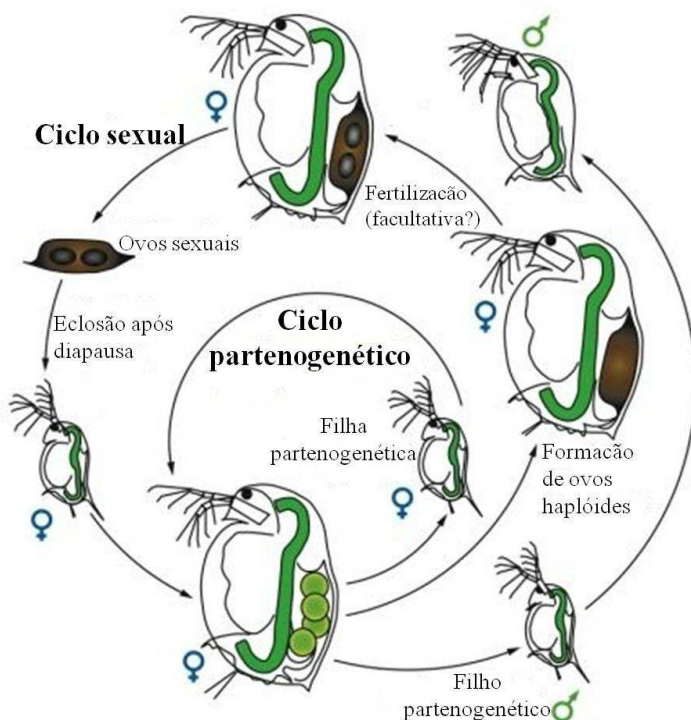


Figura 2 - Ciclo de vida de espécies do gênero *Daphnia*. Adaptado de Dita B. Vizoso, em Ebert (2005).

2.9 *Daphnia magna* STRAUSS

Daphnia magna tem sido utilizada em pesquisas biológicas desde o século XVIII (Schaffer, 1755), sendo alvo de muitos estudos em evolução e ecologia (Routtu *et al.*, 2010), e a espécie de cladóceros mais utilizada em toxicologia (Freitas & Rocha, 2009). A espécie é utilizada em ensaios padronizados de toxicologia, descritos em normas internacionais e empregados rotineiramente para a determinação da toxicidade de substâncias (ISO, 1982; 2000; OECD, 2004; 2008).

Dentre os cladóceros, *D. magna* possui tamanho relativamente grande (até 5 mm), sendo amplamente distribuída no hemisfério norte, especialmente na região paleártica (Benzie, 2005). A espécie detém importância ecológica em ambientes de água doce, sendo um

consumidor generalista que pode se alimentar de partículas em uma ampla gama de tamanhos, de 0,6 a 50 μm (Geller & Muller, 1981). É um dos principais consumidores de algas unicelulares e ao mesmo tempo presa favorita de muitos peixes (Lampert, 2006).

Daphnia magna faz parte do subgênero *Ctenodaphnia*, o qual foi reportado possuir 10 cromossomos ($2n=20$) (Beaton & Hebert, 1994), com a ausência de cromossomos sexuais, sendo a determinação do sexo induzida por fatores ambientais, de modo que o mesmo genótipo pode ser tanto masculino quanto feminino (Routtu *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de dietas à base de folhas de milho geneticamente modificado (evento MON810) e de sua linha isogênica, na sobrevivência, crescimento e diversos parâmetros reprodutivos de *D. magna* durante experimento crônico em laboratório.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Avaliar a sobrevivência de *D. magna* submetida a dietas à base de folhas de milho Bt (PAN 6Q-321B) e da isolinha (PAN 6Q-121);

Hipóteses:

Nula: Não existe diferença significativa na sobrevivência de *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt e de milho isogênico.

Alternativa: Existe diferença significativa na sobrevivência de *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt e de milho isogênico.

2 – Medir ao longo do tempo o tamanho corporal de *D. magna* submetida a dietas à base de folhas de milho Bt (PAN 6Q-321B) e da isolinha (PAN 6Q-121);

Hipóteses:

Nula: Não existe diferença significativa no tamanho corporal de *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt e de milho isogênico.

Alternativa: Existe diferença significativa no tamanho de *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt e de milho isogênico.

3 – Verificar o tempo até a maturidade sexual e até a primeira reprodução em *D. magna*, submetida à dietas à base de folhas de milho Bt (PAN 6Q-321B) e da isolinha (PAN 6Q-121);

Hipóteses:

Nula: Não existe diferença significativa entre tratamentos quanto ao tempo necessário até a maturidade sexual e até a primeira reprodução.

Alternativa: Existe diferença significativa entre tratamentos quanto ao tempo necessário até a maturidade sexual e até a primeira reprodução.

4 – Avaliar a frequência de fêmeas reprodutivas e que produziram *ephippiae* em *D. magna* submetida à dietas à base de folhas de milho Bt (PAN 6Q-321B) e da isolinha (PAN 6Q-121);

Hipóteses:

Nula: Não existe associação dos tratamentos com a frequência de ocorrência de reprodução ou produção de *ephippium*.

Alternativa: Existe associação dos tratamentos com a frequência de ocorrência de reprodução ou produção de *ephippium*.

5 – Avaliar a fecundidade e a percentagem de abortos acumuladas ao longo do tempo em *D. magna*, submetida à dietas à base de folhas de milho Bt (PAN 6Q-321B) e da isolinha (PAN 6Q-121);

Hipóteses:

Nula: Não existe diferença significativa na fecundidade e percentagem de abortos em *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt e de milho isogênico.

Alternativa: Existe diferença significativa na fecundidade e percentagem de abortos em *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt e de milho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado no teste de toxicidade em *D. magna* (folhas de milho) foi retirado de plantas tomadas ao acaso, no início do estágio de desenvolvimento R3 – grão leitoso (Ritchie *et al.*, 1992) da variedade GM PAN 6Q-321B (evento MON810) e sua linha isogênica PAN 6Q-121. As plantas, oriundas de sementes obtidas na África do Sul, foram cultivadas em câmaras de crescimento sob condições controladas de nutrição, temperatura, luminosidade e umidade, no *Institute of Integrative Biology* do Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich, Suíça.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Amostras retiradas da porção longitudinal média de folhas de milho (ver Székács *et al.*, 2010) liofilizadas, excluindo a nervura central, foram moídas até obtenção de um pó fino e armazenadas a -70 °C até o preparo das soluções de alimentação de *D. magna*. Objetivando prover partículas de tamanho comestível para *D. magna* ($\leq 50 \mu\text{m}$), quantidades de pó de folhas de milho estabelecidas em testes preliminares (2000 mg) foram misturadas a 500 ml de água ultrapura, e as “soluções” resultantes foram filtradas em redes de plâncton com 50 μm de abertura da malha. As soluções de alimentação foram mantidas a 2 °C enquanto o material retido nas redes de plâncton foi seco em estufa a 40 °C até peso constante (~ 48 h). A quantidade de material retido nas redes de plâncton foi pesada, e a quantidade de material nas soluções de alimentação (tamanho de partícula $\leq 50 \mu\text{m}$) foi calculada pela diferença. As soluções de alimentação foram então diluídas para 1 mg C ml⁻¹ (miligramas de carbono por ml), com base em dados de Latshaw (1924), aliquotadas e mantidas a -70 °C até oferecimento para *D. magna*, com uma alíquota sendo descongelada por dia por solução de alimentação.

4.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Proteínas totais foram extraídas de amostras de 50 mg de pó de folhas de milho com o kit P-PER Plant Protein Extraction (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, e adicionando um coquetel inibidor de protease cOMplete® 1x (Roche, Mannheim, Alemanha) à solução de trabalho P-

PER, na proporção 1:100. Tubos Eppendorf Lo-bind foram utilizados em todos os extratos, e os extratos proteicos foram imediatamente aliquotados e mantidos a -70°C até utilização. A concentração de proteínas totais foi estimada pelo método de Bradford com o kit Quick Start Bradford Protein nl (Bio Rad, Hercules, CA, USA), usando albumina bovina sérica (ABS) como padrão, nas concentrações 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e $1,0\text{ mg ml}^{-1}$. Alíquotas de $5\text{ }\mu\text{l}$ das amostras e dos padrões diluídos em tampão HEPES (pH 7.0) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) na proporção 1:4 foram adicionadas aos pocinhos de uma microplaca de 96 pocinhos (BMG Labtech) em triplicata, e a absorbância lida em leitor de microplacas FLUOstar OPTIMAL (BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) a 595 nm. Os extratos foram utilizados na análise de Cry1Ab por *Immunoblotting*.

4.4 IDENTIFICACAO DE Cry1Ab POR IMMUNOBLOTTING

Amostras para SDS-PAGE foram preparadas em triplicatas técnicas, pela adição de volumes variáveis de acordo com o extrato (ajustando para $20\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas totais), $5\text{ }\mu\text{l}$ de tampão NuPAGE LDS (pH 6.8), $2\text{ }\mu\text{l}$ de DTT 1M, e completadas com água ultra-pura para $22\text{ }\mu\text{l}$. Após aquecimento por 10 min a 70°C , $20\text{ }\mu\text{l}$ das amostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10% NuPAGE® Bis-Tris (Novex, Sandiego, CA, USA). As proteínas foram transferidas por *eletroblotting* para membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA). Os *blots* foram detectados com *policlonal rabbit-Anti-Bt Cry1Ab* (Abraxis, Warminster, PA, USA) (anticorpo primário) diluído 1:1000 em tampão de bloqueamento (3% leite em pó desnatado, 10 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5), seguido de anticorpo *goat anti-rabbit IgG* conjugado à fosfatase alcalina (AP) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) (anticorpo secundário) diluído 1:2000 em tampão de bloqueamento, e revelação com substrato quimiluminescente CDP-Star® (Roche, Mannheim, Alemanha) diluído 1:500 em tampão CDP-Star (1% diethanolamina, 0,02% MgCl_2 , pH 9.5) em leitor ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE Cry1Ab POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSSORBENT ASSAY)

Cinquenta mg de pó de folhas das seis plantas de milho foram utilizadas para quantificação de Cry1Ab por ELISA. Adicionalmente, as seis soluções de alimentação foram testadas quanto à concentração de

Cry1Ab nas partículas de folhas de milho, após o término do experimento. A quantificação da proteína Cry1Ab foi realizada com o kit Agdia Cry1Ab/Cry1Ac DAS ELISA (*Double Antibody Sandwich ELISA*) (Agdia, Elkhart, IN, USA) seguindo as instruções do fabricante, com modificações: por se tratar de um kit qualitativo, a quantificação de Cry1Ab foi realizada através de uma curva padrão da proteína Cry1Ab purificada de *E. coli* transformada (Abraxis, Warminster, PA, USA), conforme especificado pelo fornecedor. A determinação analítica de Cry1Ab foi realizada através do cálculo da curva padrão por regressão, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 ng mL⁻¹ de Cry1Ab. Cry1Ab foi extraída misturando-se 1 ml de solução de partículas de folhas de milho (2,42 mg de folhas) com 200 µl de PBST. Tubos Eppendorf Lo-bind foram utilizados em todos os extratos. Alíquotas de 100 µl dos extratos de cada amostra, do branco (PBST) e dos padrões foram adicionadas aos pocinhos de uma microplaca de 96 pocinhos (Agdia) em três replicatas técnicas. Após a adição da solução de substrato TMB e incubação por 20 min, a reação foi parada com HCl 3N, e a absorbância lida em um leitor de microplacas FLUOstar OPTIMAL (BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) a 492 nm.

4.6 MANUTENÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Daphnia magna*

A alimentação básica das populações de *D. magna* foi realizada com a micro-alga *Scenedesmus dimorphus*, cultivada em meio de cultura para algas verdes unicelulares (Kuhl & Lorenzen, 1964). O cultivo de *S. dimorphus* foi realizado em frascos de vidro com capacidade para 1 L, mantidos a 23 °C ± 2 com aeração contínua e sob iluminação artificial de lâmpadas de espectro completo com intensidade de 75 uE m² s⁻¹. Após o cultivo de cada lote as soluções de cultivo foram quantificadas em espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) a 440 nm para determinação da densidade óptica e aferição do conteúdo de carbono (mg C mL⁻¹) através de um nomógrafo para carbono orgânico total previamente estabelecido. Após a quantificação as soluções foram mantidas em refrigerador a 4 °C e utilizadas na alimentação das dáfias por um período máximo de sete dias, sendo então substituídas por um lote de alga recém cultivado.

As populações de *D. magna* foram mantidas em meio de cultivo Elendt M7 (Elendt, 1990; OECD, 2008) por diversas gerações antes do estabelecimento do experimento. O mesmo meio de cultivo foi utilizado no experimento. A alimentação dos animais nas populações consistiu da adição de 0,2 mg C de *S. dimorphus* animal⁻¹ dia⁻¹ aos frascos de cultivo,

cada frasco de 100ml contendo uma fêmea de *D. magna*. O meio de cultivo foi renovado a cada três dias.

4.7 TESTE CRÔNICO COM *Daphnia magna* STRAUSS

Indivíduos de *D. magna* nascidos dentro de 24 horas e a partir da segunda ninhada de indivíduos adultos de uma única população clonal foram utilizados na implantação de um estudo longitudinal com duração de 42 dias. Temperaturas mínimas e máximas foram monitoradas diariamente em béqueres de 100 mL contendo meio M7, mantidos juntos aos béqueres do experimento. O pH e a condutividade elétrica foram medidos com um medidor HI98129 (Combo) (Hanna Instruments, Smithfield, RI, USA) e a concentração de oxigênio foi monitorada com um medidor de oxigênio dissolvido DO200 (YSI Incorporated, Yellow Spring, OH, USA), uma vez a cada sete dias em três béqueres de cada tratamento, em meio fresco (quando da renovação do meio de cultivo) e usado (três dias após a renovação).

O experimento teve um desenho completamente casualizado, com dois fatores fixos, *variedade* (níveis: dietas de folhas de milho Bt e milho isogênico) e *tempo* (níveis: intervalos de 3 dias para fecundidade e abortos, nove dias para tamanho corporal, e um dia para os demais *endpoints*), e o fator aleatório *planta* (três plantas aleatórias em cada variedade de milho), aninhado no fator *variedade*.

Com o objetivo de prevenir vieses e diminuir o erro experimental, o experimento foi conduzido em formato duplo-cego, através da atribuição de um código de cores aos níveis do fator *planta* (as soluções de alimentação de folhas de três plantas de milho GM e três plantas de milho isogênico) e às respectivas unidades experimentais. A atribuição e anotação do código de cores couberam a duas pessoas que não tomaram parte em nenhuma outra atividade relacionada ao experimento, e somente estas pessoas tiveram conhecimento do significado do código até o fim do experimento e de todas as aferições.

Duzentos e dez indivíduos juvenis foram distribuídos aleatoriamente entre os níveis do fator *planta*, colocados em béqueres individuais numerados contendo 100 mL de meio Elendt M7. Noventa animais foram designados para cada nível do fator *variedade*, sendo trinta animais em cada nível da variável *planta*. Trinta animais foram designados para o controle interno (alga), com o objetivo de verificar se pré-requisitos para a validade do teste, de acordo com a OECD (2008), foram satisfeitos. Todos os dias, indivíduos receberam 200 µL (0,2 mg

C) de solução de partículas de folha de milho, ou 0,2 mg C de solução da alga *S. dimorphus*.

Cada indivíduo foi inspecionado diariamente quanto à sobrevivência. Animais sem batimento cardíaco por mais de 10 segundos foram considerados mortos. O sexo dos animais foi determinado no primeiro dia de coleta de dados de tamanho corporal (dia nove), ou por ocasião da morte, se esta ocorreu antes do nono dia de experimento.

O tempo até a primeira reprodução (liberação da primeira ninhada) de cada animal foi determinado pela inspeção diária dos béqueres. Por ocasião da renovação do meio de cultivo (a cada três dias), foi realizada a inspeção de fecundidade (contagem de juvenis) e de abortos (juvenis mal-formados e ovos) (Figura 3), após a transferência das mães para novos béqueres com meio de cultivo previamente adicionados do respectivo alimento. Os juvenis eram então filtrados com uma rede de plâncton (abertura de malha de 150 μ m) e contados em estereomicroscópio Leica MZ6 (Leica Microsystems (Schweiz) AG, Heerbrugg, Suíça).

Os animais e uma escala de 2 mm (precisão de 0,01 mm) foram fotografados (Figura 3) nos dias 9, 18, 27, 36 e 42, com câmera Nikon D90 acoplada a estereomicroscópio Leica Wild M8 (Leica Microsystems (Schweiz) AG, Heerbrugg, Suíça), e o tamanho dos animais (comprimento do topo cabeça até a base da espinha caudal) foi medido através do software ImageJ (Rasband, 1997-2008).

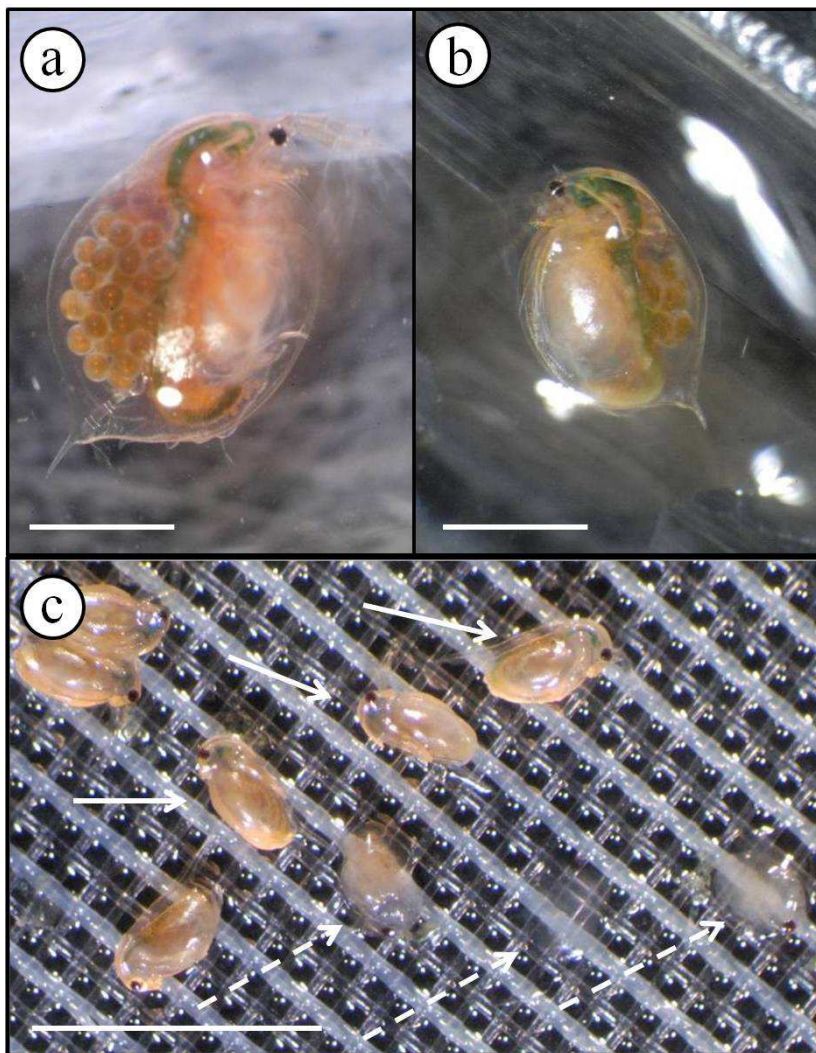


Figura 3 - Indivíduo típico de 27 dias de idade alimentado com *Scenedesmus dimorphus* (a); indivíduo típico de 27 dias de idade alimentado com folhas de milho (b); juvenis saudáveis (setas com linha inteira) e abortos (setas com linha tracejada) (c). Barras de escala têm 2 mm. Fotos: Daniel Ferreira Holderbaum, Tromsø, 2011.

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

4.8.1 Quantificação de Cry1Ab por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

As análises foram realizadas utilizando o software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2006). Uma curva padrão foi determinada por regressão de mínimos quadrados, comparando o ajuste de regressões linear, quadrática e cúbica pelo Critério da Informação Bayesiano de Schwarz (BIC) (Schwarz, 1978). Os dados de concentração de Cry1Ab em partículas de folhas de milho nas soluções de alimentação foram submetidos à análise de variância e verificados graficamente quanto à homoscedasticidade e normalidade dos resíduos.

4.8.2 Teste crônico com *Daphnia magna* Strauss

As análises foram realizadas no software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2006). Dados de sobrevivência e de tempo até a primeira reprodução, tratadas como variáveis dicotômicas (ocorrência ou não do evento) foram analisados por regressão de Cox para riscos proporcionais (Cox, 1972). A proporção de matrizes que atingiram o estado reprodutivo foi analisada pelo teste de χ^2 , e a proporção de indivíduos que produziram *ephippiae* (ovos de dormência) foi analisada com o teste exato de Fisher (já que havia células com valores menores do que 5), em tabelas de contingência. O tamanho dos animais (variável resposta contínua), a fecundidade acumulada e a percentagem de abortos acumulada (variáveis resposta de contagem) foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos de um modelo linear por inspeção de Q-Q Plots e quanto à homogeneidade de variâncias entre tratamentos por Box-Plots. O conjunto de dados para o tamanho dos animais foi o único a se adequar à pressuposição de normalidade dos resíduos, e nenhum dos conjuntos se adequou à homogeneidade de variâncias, o que é comum em dados longitudinais. O tamanho corporal dos animais foi analisado em um modelo misto assumindo normalidade dos resíduos, levando em conta a dependência entre medidas repetidas (dados longitudinais) e a consequente estrutura da matriz de variâncias-covariâncias (Littell *et al.*, 2006). Modelos pressupondo as estruturas de matriz de variância-covariância, componentes da Variância (VC) e diversas estruturas plausíveis para dados longitudinais (autorregressiva de primeira ordem (AR(1)), autorregressiva de primeira ordem heterogênea (ARH(1)), Toeplitz (TOEP), Toeplitz heterogênea

(TOEPH), antedependência de primeira ordem (ANTE(1)) e Não-estruturada (UN)) foram comparados com o BIC, e o modelo com o menor BIC foi escolhido como o de melhor ajuste e utilizado para se fazer inferências. Conforme o esperado de acordo com a natureza dos dados relativos à fecundidade e percentagem de abortos (dados de contagem e proporções, respectivamente), a distribuição dos resíduos desviou substancialmente da distribuição normal e também da homogeneidade de variâncias, e estes dados foram analisados com modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972; McCullagh & Nelder, 1989). Foram empregadas equações de estimação generalizadas (*Generalized Estimating Equations* – GEE) (Liang & Zeger, 1986) assumindo distribuição Poisson com parâmetro extra para levar em conta a super-dispersão (quando as variâncias excedem as médias), utilizando a função de ligação canônica (logaritmo), e levando em conta a correlação entre as observações feitas ao longo do tempo em um mesmo indivíduo e a consequente estrutura da matriz de variâncias-covariâncias. Os modelos com estruturas de matriz de variância-covariância independência (INDEP), autorregressiva (AR) e não-estruturada (UN) foram comparados por meio do Critério da Quasi-verossimilhança sob o modelo de independência (*Quasi-likelihood under the independence model criterion* – QIC) (Pan, 2001), e o modelo com o menor QIC foi escolhido como o de melhor ajuste e utilizado para se fazer inferências. Para as variáveis tamanho corporal, fecundidade e percentagem de abortos, quando verificados efeitos significativos ($P \leq 0,05$) para a interação *variedade*tempo*, a direção dos efeitos significativos em cada nível do fator *tempo* foi determinada por contrastes entre os dois níveis do fator *variedade*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE Cry1Ab

Duas bandas imunorreativas de Cry1Ab foram detectadas por *immunoblotting* (Figura 4), uma com 69 kDa, o peso usualmente reportado para a proteína codificada em milhos com o evento MON810, e uma outra banda com cerca de 35 kDa, indicando que um processamento pós-transcrição ou pós-tradução esteja ocorrendo (Andow & Hilbeck, 2004). A suposta banda de 92 kDa referente à proteína Cry1Ab traduzida em milhos com o evento MON810 (CERA, 2010) não foi encontrada. Outros estudos (Grubber *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2010) encontraram uma banda de 34 kDa para Cry1Ab em milho MON810, além de bandas imunorreativas de 42 e 17 kDa (não observadas neste estudo), atribuindo sua presença à contínua atividade de proteases endógenas da planta. Além disso, é interessante notar que a amostra de Cry1Ab purificada de *E. colli* transformada, utilizada como controle positivo, mostrou diversas bandas com diferentes pesos moleculares, incluindo a banda esperada de 131 kDa para a pró-toxina e uma banda com 69 kDa (núcleo ativo da proteína), mas não uma banda com 35 kDa, conforme verificado nas folhas de milho Bt, assim evidenciando uma característica notável de Cry1Ab recombinante expressa em folhas de milho MON810. Este fato detém clara relevância para os riscos ambientais do milho MON810, já que estas proteínas representam um efeito não intencional, e não foram testadas quanto à sua toxicidade.

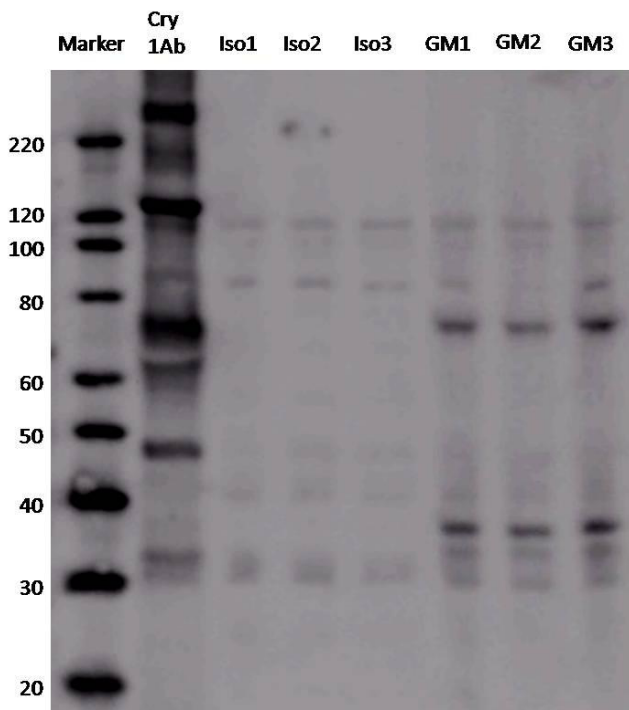


Figura 4 - *Immunoblotting* mostrando a presença de bandas esperadas para Cry1Ab truncado (~ 69 kDa) e de bandas não esperadas (~ 35 kDa) em três plantas (GM1, GM2 e GM3) de milho Bt (MON810), e ausência das bandas em três plantas da isolinha (Iso1, Iso2 e Iso3).

As equações de regressão para absorbância em função da concentração nominal de Cry1Ab, de ordem linear, quadrática e cúbica foram ajustadas por regressão polinomial dos mínimos quadrados ordinários e comparadas quanto ao ajuste pelo Critério de Informação Bayesiano de Schwartz (BIC). Todas as regressões foram significativas ($P > 0,001$), e a regressão cúbica ($R^2 = 0,98$) mostrou o melhor ajuste pelo BIC (menor valor), sendo utilizada para construção da curva de calibração para Cry1Ab (Figura 5).

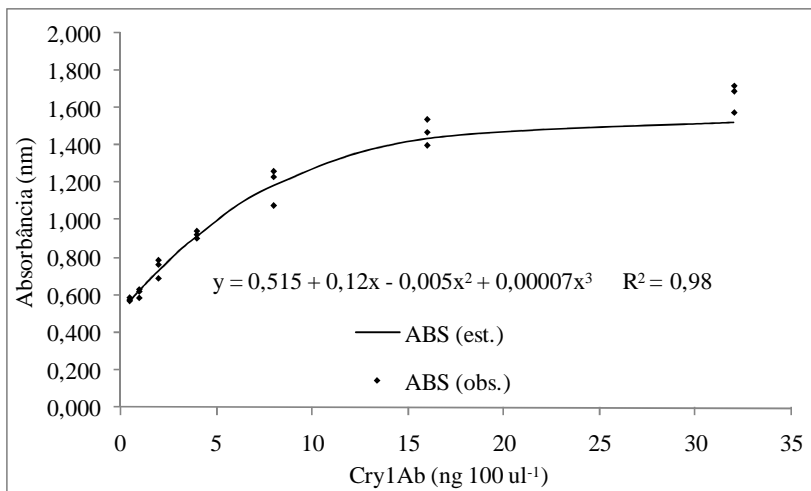


Figura 5 - Curva padrão da absorbância (492 nm) em função da concentração do padrão de Cry1Ab, e a respectiva equação da regressão cúbica utilizada para estimação da concentração de Cry1Ab nas folhas de milho em ensaio de ELISA. ABS (est.): absorbância estimada. ABS (obs.): absorbância observada.

A concentração de Cry1Ab nas partículas de folhas de milho Bt dentro das soluções de alimentação foi estimada (Figura 6), e não foram encontradas diferenças significativas entre soluções (ANOVA, Tabela 1). Nguyen & Jehle (2007) e Székács *et al.* (2010) mostraram que o nível de expressão de Cry1Ab em folhas de milho Bt (MON810) pode variar significativamente entre plantas, o que foi verificado nas folhas de milho Bt utilizadas neste estudo, antes do preparo das soluções de alimentação (dados não mostrados). Porém, durante o processamento das amostras no preparo das soluções de alimentação de *D. magna* provavelmente houve degradação de Cry1Ab, como consequência do contato das partículas de folhas de milho com a água e o tempo decorrido até o congelamento das soluções (~ 48 h), o que nivelou a concentração da toxina nas soluções de alimentação oferecidas aos animais.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para concentração de Cry1Ab obtida em ensaio de ELISA em folhas de diferentes plantas de milho transgênico (MON810).

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Pr > F
Planta	2	0,69	0,35	1,59	0,28
Resíduo	6	1,31	0,22		
Total	8	2,00			

CV% = 21.7

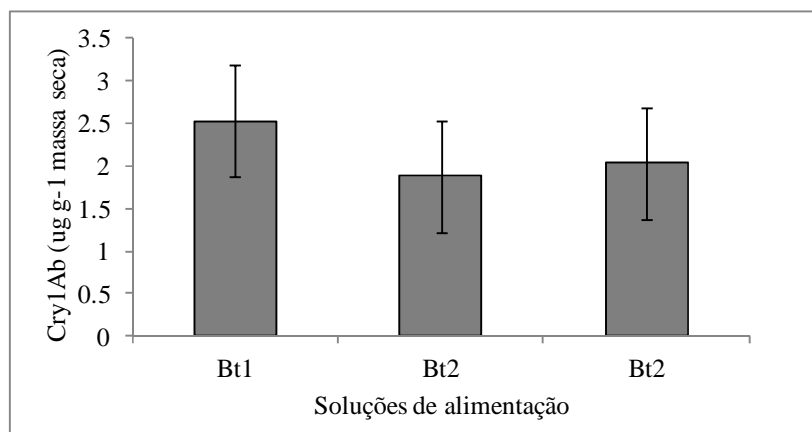


Figura 6 - Concentração média de Cry1Ab nas partículas de folhas de milho Bt (MON810) presentes nas soluções de alimentação. Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=3).

5.2 TESTE CRÔNICO COM *Daphnia magna* STRAUSS

5.2.1 Temperatura e parâmetros físico-químicos do meio de cultivo

A média das temperaturas mínimas e seu desvio padrão (média \pm desvio padrão) foi $19,82 \pm 1,35$, e a média das temperaturas máximas e seu desvio padrão foi $21,6 \pm 0,60$. A média e o desvio padrão dos três parâmetros físico-químicos analisados (pH, condutividade elétrica (μ S) e oxigênio dissolvido (% O₂) em meio Elenndt novo e usado, para o controle interno (dieta de alga) e para os tratamentos Isolinha e Milho Bt, mostrou uma tendência ao aumento da condutividade elétrica, e diminuição do pH e do oxigênio dissolvido nos tratamentos de folhas de milho, mas não no controle interno (alga), que mostrou tendência ao aumento nos três parâmetros (Tabela 2). A redução do pH e aumento da

condutividade elétrica nos tratamentos de folhas de milho podem ser explicados pela excreção de compostos orgânicos pelas dáfrias e seu juvenis, e a diminuição do oxigênio pela respiração das dáfrias e de possíveis micro-organismos. Já no meio adicionado com alga, o aumento do pH pode ser explicado por uma diminuição da concentração de CO_2 dissolvido como decorrência do processo fotossintético (Lampert & Sommer, 1997), o aumento acentuado da condutividade elétrica pode ser uma decorrência da excreção de compostos orgânicos por indivíduos maiores que produzem um maior número de juvenis, e o aumento do oxigênio dissolvido é explicado pela fotossíntese das algas adicionadas ao meio.

Tabela 2 - Médias \pm desvio padrão dos parâmetros físico-químicos pH, condutividade elétrica (μS) e oxigênio dissolvido ($\text{O}_2(\%)$) em meio de Elendt fresco (imediatamente antes da transferência dos animais) e usado (3 dias após a transferência dos animais), para o controle interno (dieta de alga) e para os tratamentos Isolinha e Milho Bt.

Parâmetro	Meio de cultivo	Dieta		
		Alga	Isolinha	Milho Bt
pH	Meio Fresco	7,94 \pm 0,24	8,26 \pm 0,26	8,29 \pm 0,29
	Meio Usado	8,52 \pm 0,42	8,08 \pm 0,22	8,09 \pm 0,26
μS	Meio Fresco	642,50 \pm 10,96	618,54 \pm 16,96	616,42 \pm 17,31
	Meio Usado	743,93 \pm 31,98	667,95 \pm 42,15	669,28 \pm 48,26
$\text{O}_2 (\%)$	Meio Fresco	8,61 \pm 0,32	8,40 \pm 0,15	8,44 \pm 0,26
	Meio Usado	10,39 \pm 1,20	8,28 \pm 0,85	8,30 \pm 0,81

5.2.2 Resposta de *Daphnia magna* no controle interno (dieta de alga)

Os animais alocados no controle interno (alimentados com a alga *Scenedesmus dimorphus*) mostraram tamanho corporal e fecundidade claramente maiores do que animais alimentados com folhas de milho, atestando a superioridade nutricional de uma dieta de algas para *D. magna*. A taxa de mortalidade aos 21 dias de idade foi de 20%, sendo este valor o máximo aceitável para mortalidade em controles de testes de reprodução de *D. magna* (OECD, 2008). Dentre os animais vivos no 21º dia (80%), a fecundidade média acumulada foi de 114 juvenis. Estes resultados validam o teste de acordo com as normas da OECD para

testes crônicos de toxicidade de substâncias em *D. magna* (OECD, 2008).

5.2.3 Sobrevivência

Não foi verificada diferença significativa na velocidade de ocorrência de mortalidade entre animais alimentados com folhas de milho Bt e da variedade isogênica ($\chi^2 = 0,524$, $P = 0,469$, regressão de Cox), aceitando-se a hipótese nula. A probabilidade de morte dos animais foi semelhante entre tratamentos ao longo do experimento (Figura 77), mostrando não haver efeitos letais do uso de folhas de milho Bt na dieta de *D. magna* em comparação à isolinha.

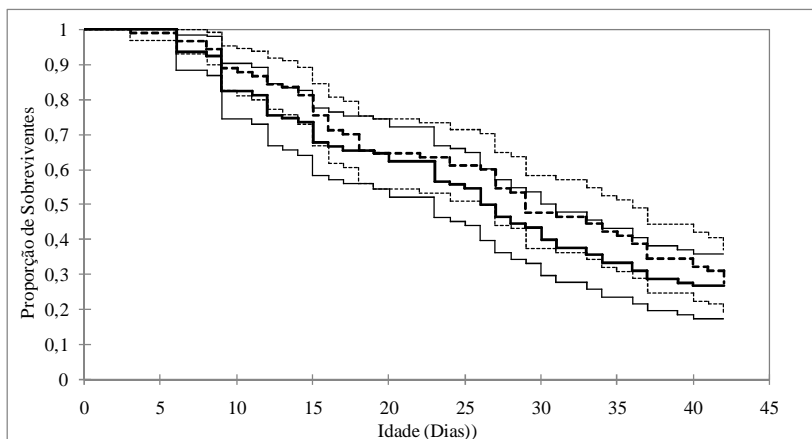


Figura 7 - Curvas de sobrevivência para animais alimentados com folhas de milho isogênico (linha sólida) e milho Bt (linha tracejada). Linhas fracas indicam bandas de confiança a 95% de probabilidade (n=90).

Estes resultados sugerem que a toxina Cry1Ab expressa nesta variedade de milho não exerce um efeito letal em *D. magna*. Proteínas cristalinas inseticidas como Cry1Ab, produzidas por *Bacillus thuringiensis* na forma de pró-toxinas, são conhecidas por exercer efeitos letais em algumas espécies de insetos lepidópteros e coleópteros (Hilbeck & Schmidt, 2006). Sob digestão parcial por proteases no trato intestinal dos insetos alvo, proteínas Cry são convertidas na forma ativa, que exerce o efeito tóxico (Ferré, 2002). No entanto, em plantas transgênicas, Cry1Ab é expressa em uma forma ativa que não necessita

ser clivada no trato gastrointestinal de insetos alvo, o que traz incertezas quanto a efeitos letais e sub-letais em organismos não-alvo (Hilbeck & Schmidt, 2006). Steinberg *et al.* (2010) mostraram que o tempo de vida de *Daphnia* pode aumentar sob condições de baixo estresse, aliado a uma redução na fecundidade, enquanto outros trabalhos (Lürting & Van der Grinten, 2003; Dao *et al.*, 2010), mostraram não haver efeito na sobrevivência de *D. magna* submetida a baixos níveis da toxina microcistina (produzida pela cianobactéria *Microcystis sp.*). Bøhn *et al.* (2008) encontraram uma redução na sobrevivência de *D. magna* alimentada com grãos moídos de milho Bt em comparação à isolinha, atribuindo esta redução a um efeito tóxico brando de Cry1Ab. No entanto, Bøhn *et al.* (2008) admitiram que a baixa concentração de Cry1Ab nos grãos utilizados (67 ± 27 ng de Cry1Ab g⁻¹ peso seco) poderia indicar a existência de outras causas para o efeito negativo do milho GM. Considerando que folhas de milho Bt detêm concentrações muito maiores de Cry1Ab do que os grãos, esperava-se neste estudo um efeito pronunciado do milho Bt na sobrevivência dos dafnídeos no caso de um efeito tóxico direto de Cry1Ab, o que não foi o observado, levando em conta que neste estudo a concentração de Cry1Ab (média \pm desvio padrão) foi de $2,15 \pm 0,5$ (ug g⁻¹ peso seco de folhas) nas soluções de alimentação, ou cerca de 30 vezes maior do que nos grãos utilizados por Bøhn *et al.* (2008). Vale ressaltar que Buhl *et al.* (1993) e Villarroel *et al.* (2003) declaram a sobrevivência como um indicador de toxicidade crônica menos eficiente do que a reprodução em *D. magna*.

5.2.4 Tamanho corporal

Na análise da variável dependente tamanho corporal, uma estrutura de matriz de variâncias-covariâncias Toeplitz com variâncias heterogêneas mostrou o melhor ajuste de acordo com o BIC (Tabela 3), e foi utilizada para a realização de inferências.

Tabela 3 - Comparações entre estruturas de matriz de covariância para seleção do modelo de melhor ajuste para análise da variável tamanho. O menor valor de BIC (melhor ajuste) está em negrito.

Variável Dependente	Distribuição	Matriz de Variância-Covariância	BIC
Tamanho	Normal	VC	-338,5
		AR(1)	-427,7
		ARH(1)	-503,9
		TOEP	-424,1
		TOEPH	-508,1
		ANTE(1)	-488,5
		UN	-479,2

A presença de interação significativa entre os fatores *variedade* e *tempo* (Tabela 4) leva à rejeição da hipótese nula, e indica que animais alimentados com folhas de milho Bt e da isolinha mostraram tamanhos diferentes, sendo esta diferença dependente do tempo. Contrastes entre milho Bt e milho isogênico dentro de cada nível de *tempo*, bem como a inspeção dos intervalos de confiança (Figura 88) mostram que no início da vida (dias 9 e 18) o tamanho dos animais sob as duas dietas não foi significativamente diferente ($P > 0,05$ em ambas as datas). A interação ficou evidente ao se constatar que nas três datas subsequentes de aferição do tamanho (dias 27, 36 e 42), animais alimentados com folhas da variedade isogênica mostraram maior tamanho do que animais alimentados com folhas de milho Bt ($P < 0,001$ nos três contrastes), com uma diferença de até 0.14 mm, ou cerca de 4%, tomado a maior média como 100%.

Tabela 4 - Tabela da análise de modelo misto para a variável tamanho de matrizes alimentadas com folhas de milho Bt ou milho isolinha (fator variedade) ao longo do tempo (fator tempo).

Testes do Tipo 3 para Efeitos Fixos			
Fonte de Variação	GL	F	Pr > F
Tempo	4	707,23	< 0,0001
Variedade	1	10,62	0,0014
Variedade*Tempo	4	5,35	0,0004

Observou-se que animais alimentados com folhas de milho Bt apresentaram tamanho significativamente menor do que animais alimentados com folhas da linha isogênica após o período de máxima reprodução, situado entre os dias 15 e 21. A redução no comprimento de carapaça de *D. magna* ou outros cladóceros ao longo da vida já foi atribuída a diferentes causas, entre elas altas concentrações de agrotóxicos (Villaruel *et al.*, 2003 e referências), concentrações subletais de diferentes metais (Van Leeuwen *et al.*, 1985) e diferentes qualidades nutricionais da dieta (Twombly *et al.*, 1998; Müller-Navarra, 1995; Wacker & Martin-Creuzburg, 2007). Portanto, uma maior dificuldade na assimilação do material transgênico, seja por um efeito tóxico, seja por uma composição nutricional diversa, poderia refletir em menos energia disponível para crescimento e reprodução. Efeitos adversos em parâmetros relacionados ao *fitness*, entre eles a redução do crescimento, podem ser induzidos pela inibição de processos digestivos em dafnídeos e a consequente má nutrição (Rohrlack *et al.*, 2003; Czarnecki *et al.*, 2006). Segundo Chandini (1989) e referências contidas, poluentes aquáticos que afetem o tamanho de cladóceros podem influenciar indiretamente em diversos parâmetros relevantes à dinâmica populacional, detendo assim importantes consequências ecológicas. Indivíduos de maior tamanho possuem maior habilidade para coletar alimento, melhor defesa contra predadores invertebrados e peixes juvenis, superioridade competitiva, ninhadas maiores e recém-nascidos de maior tamanho. Uma redução no tamanho dos indivíduos poderia afetar muitos dos benefícios relacionados ao maior tamanho, especialmente durante períodos de escassez de alimentos e alta competição (Chandini, 1989).

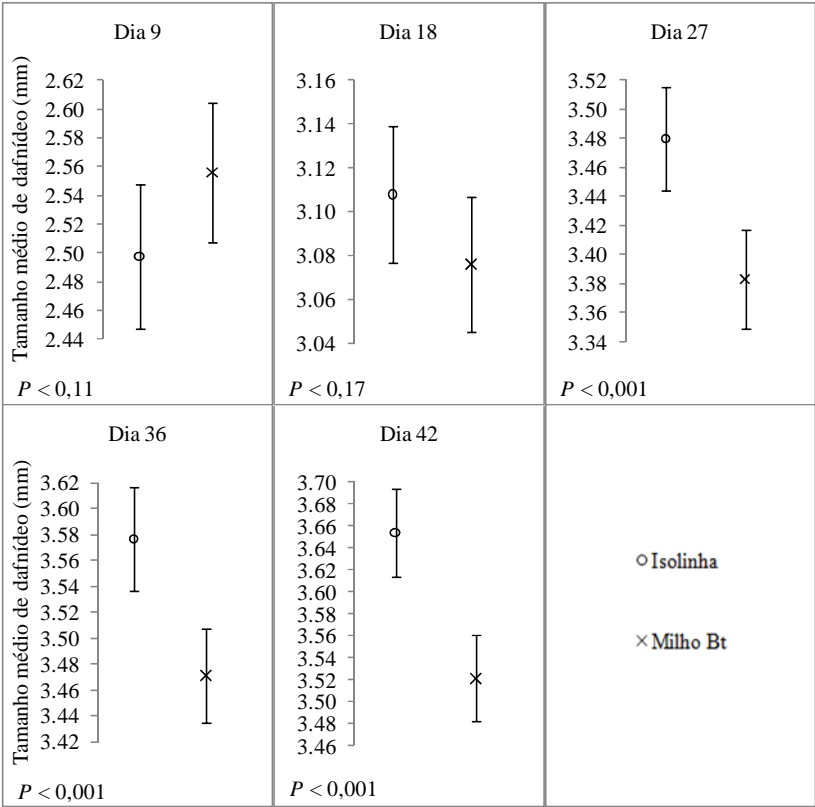


Figura 8 - Tamanho médio de matrizes de *D. magna* alimentadas com folhas de milho Bt e milho isogênico, ao longo do tempo. Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=90). *P* indica o P-valor obtido no contraste.

5.2.5 Proporção de indivíduos reprodutivos

Não foi verificada associação entre o número de fêmeas que atingiram o estado reprodutivo e a dieta provida aos animais (folhas de milho Bt ou da isolinha) ($P = 0,543$, teste de χ^2), aceitando-se a hipótese nula. Ao todo 151 animais tiveram ao menos um evento reprodutivo durante o experimento, sendo 77 destes animais alimentados com folhas de milho Bt e 74 com folhas de isolinha (Tabela 5).

Tabela 5 - Tabela de contingência para a variável número de fêmeas reprodutivas de *D. magna* sob dietas de folhas de milho Bt e da variedade isogênica.

Variedade	Não Reproduziu	Reproduziu	Total
Isolinha	16	74	90
Milho Bt	13	77	90
Total	29	151	180

5.2.6 Tempo até a maturidade sexual e até a primeira reprodução

Não foi verificada diferença significativa na velocidade de ocorrência da maturidade sexual entre animais alimentados com folhas de milho Bt e da variedade isogênica ($\chi^2 = 0,068$, $P = 0,794$, regressão de Cox), aceitando-se a hipótese nula. O tempo até 50% dos animais atingirem a maturidade sexual foi de 9 dias, para ambos os tratamentos (Figura 9).

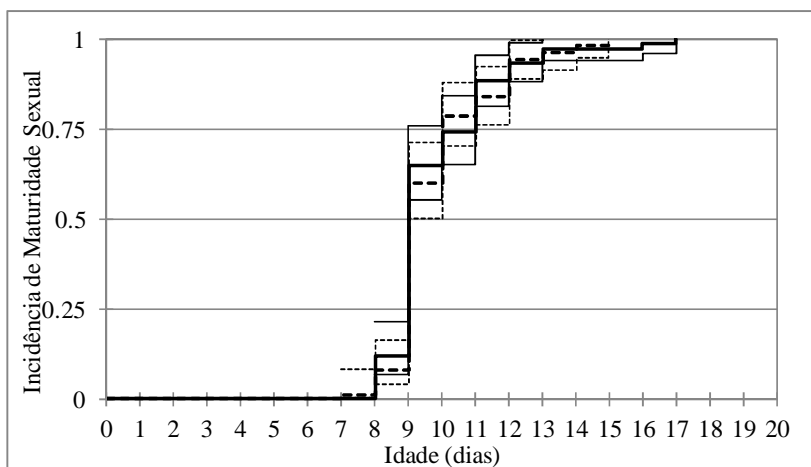


Figura 9 - Curvas de incidência cumulativa da maturidade sexual para animais alimentados com folhas da variedade isogênica (linha sólida) e de milho Bt (linha tracejada). Linhas fracas indicam bandas de confiança a 95% de probabilidade ($n = 90$; n° de eventos: Isolinha = 81, Milho Bt = 80; censurados (devido à mortalidade): Isolinha = 9, Milho Bt = 10).

Não foi verificada diferença significativa na velocidade de ocorrência da primeira reprodução entre animais alimentados folhas de com milho Bt e da variedade isogênica ($\chi^2 = 0,1595$, $P = 0,6897$, regressão de Cox), aceitando-se a hipótese nula. O tempo até 50% dos animais atingirem a primeira reprodução foi de 11 dias, para ambos os tratamentos (Figura 100).

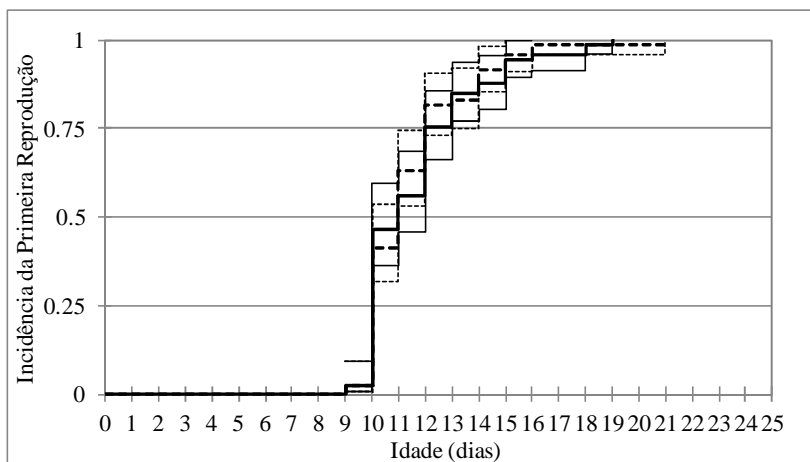


Figura 10 - Curvas de incidência cumulativa da primeira reprodução em animais alimentados com folhas de milho isogênico (linha sólida) e milho Bt (linha tracejada). Linhas fracas indicam bandas de confiança a 95% de probabilidade ($n = 90$; nº de eventos: Isolinha = 74, Milho Bt = 77; censurados (devido à mortalidade): Isolinha = 16, Milho Bt = 13).

Tanto o tempo até a maturidade quanto o tempo até a primeira reprodução não diferiram significativamente entre animais alimentados com folhas de milho Bt e da isolinha, mais uma vez indicando que não houve efeito tóxico, já que se esperaria um adiantamento da reprodução caso uma redução na sobrevivência (como consequência de um efeito tóxico) fosse esperada (Bøhn *et al.*, 2008). Estes resultados contrastam com o observado por Bøhn *et al.* (2008), que verificaram um adiantamento da primeira reprodução em *D. magna* alimentada com grãos de milho Bt em comparação à isolinha, atrelando este adiantamento a um efeito tóxico brando de Cry1Ab. No entanto, grãos de milho Bt têm concentrações muito mais baixas de Cry1Ab do que folhas, utilizadas neste estudo (ver sessão 6.2.3); isto poderia indicar que não foi o efeito direto de Cry1Ab que desencadeou o adiantamento da reprodução observado por Bøhn *et al.*, (2008). Entretanto, no presente

estudo efeitos de Cry1Ab podem ter sido atenuados devido à provisão de uma dieta de maior energia, evidenciada pelo maior crescimento e fecundidade dos animais alimentados com folhas ao invés de grãos de milho triturados (tamanho médio geral e fecundidade média geral, no dia 42, de ~3,6 mm e ~52 juvenis por fêmea alimentada com folhas de milho, respectivamente, e de ~2,6 mm e ~7 juvenis por fêmea alimentada com grãos de milho, respectivamente), sendo que tal efeito de modulação de efeitos tóxicos de acordo com a qualidade/quantidade da dieta já foi observado em outros estudos (Chandini, 1989; Heugens *et al.*, 2006).

5.2.7 Fecundidade

Na análise da variável dependente Fecundidade (número médio de juvenis acumulados por unidade experimental) um modelo Poisson com parâmetro para super-dispersão, assumindo uma estrutura de matriz de variâncias-covariâncias de Independência (uma matriz com ausência de elementos fora da diagonal – ausência de correlação entre medidas repetidas) mostrou o melhor ajuste de acordo com o BIC (Tabela 6).

Apesar de se esperar a existência de correlações entre observações feitas num mesmo indivíduo ao longo do tempo, Pan & Connett (2002) apontam algumas características das GEE, entre elas o fato de não ser estritamente necessário modelar a estrutura de correlações da variável resposta corretamente, bastando apenas utilizar uma estrutura de correlação de trabalho (*working correlation structure*) para se obter estimativas consistentes e assintoticamente normais. Em muitos casos foi mostrado que estimativas de GEE sob o modelo de independência mantêm uma alta eficiência (ver Pan & Connett, 2002).

Tabela 6 - Comparações entre estruturas de matriz de covariância para seleção do modelo de melhor ajuste para análise da variável fecundidade. O menor valor de QIC (melhor ajuste) está em negrito.

Variável Dependente	Distribuição	Matriz de Variância-Covariância	QIC
Fecundidade	Poisson + parâmetro para super-dispersão	INDEP	-31989,2
		AR(1)	-31937,9
		UN	-31427,9

Os resultados deste estudo mostram que a quantidade de alimento provida aos dafnídeos ultrapassou o “nível limitante incipiente” (*incipient limiting level*) (Horton, *et al.*, 1979), já que a quantidade de alimento assimilada foi suficiente para suprir os custos de manutenção e custos extras com crescimento e reprodução. A presença de interação significativa entre os fatores *variedade* e *tempo* (Tabela 7) leva à rejeição da hipótese nula, e indica que a fecundidade dos animais foi afetada significativamente pela dieta de folhas de milho Bt em comparação à linhagem isogênica, sendo esta diferença dependente do tempo. A comparação de médias por contrastes mostrou que animais alimentados com folhas de milho Bt tiveram menor fecundidade do que animais alimentados com folhas da variedade isogênica em estádios avançados da vida (Figura 111), conforme verificado em animais com 36, 39 e 42 dias de idade ($P < 0,05$ nos três contrastes). É digno de nota o fato de que aos 12 dias de vida, ou aproximadamente um dia após 50% dos animais reproduzirem pela primeira vez em ambos os tratamentos, foi observada uma diferença marginalmente significativa entre os tratamentos ($P = 0,0547$), com animais alimentados com folhas de milho Bt mostrando maior fecundidade.

Tabela 7 - Tabela de análise de GEE para a variável fecundidade de matrizes alimentadas com folhas de milho Bt ou milho isolinha (fator variedade) ao longo do tempo (fator tempo).

Estatísticas de Wald para Análise Tipo 3 de GEE			
Fonte de Variação	GL	χ^2	Pr > χ^2
Variedade	1	0,48	0,4894
Tempo	10	1301,21	<0,0001
Variedade*Tempo	10	21,16	0,02

O padrão de diferenças encontrado sugere uma menor fecundidade de animais alimentados com folhas de milho Bt em estádios avançados da vida. Além disso, evidências de uma possível maior fecundidade de animais alimentados com milho Bt no início do período reprodutivo foram encontradas. A baixa qualidade nutricional da dieta pode reduzir a fecundidade em *D. magna* (Müller-Navarra, 1995; Wacker & Martin-Creuzburg, 2007; Steinberg *et al.*, 2010), e tanto a escassez de nutrientes quanto efeitos tóxicos ocorridos durante o desenvolvimento inicial de organismos podem ter sérias consequências

de longo prazo somadas a efeitos imediatos (Matcalfe & Monagham, 2001). Uma potencial resposta plástica a condições de estresse consiste na alocação de recursos para maior reprodução no início da vida, comumente denominada de compensação de fecundidade (Chadwick & Little, 2005). Esta mudança pode ter como consequência a redução do crescimento somático e da reprodução no fim da vida, como observado em animais alimentados com folhas de milho Bt neste estudo. Além disso, tamanho corporal e fecundidade são variáveis fortemente relacionadas, tendo sido mostrado que dafnídeos menores produzem menos juvenis (Glazier, 1992). Dao *et al.* (2010) verificaram que baixas concentrações de extratos da cianobacteria *Microcystis sp.* contendo a toxina microcistina enfraqueceram dafnídeos, comprometendo sua capacidade reprodutiva, enquanto concentrações maiores afetaram sua sobrevivência, mostrando diferentes efeitos tóxicos de uma mesma toxina de acordo com sua concentração.

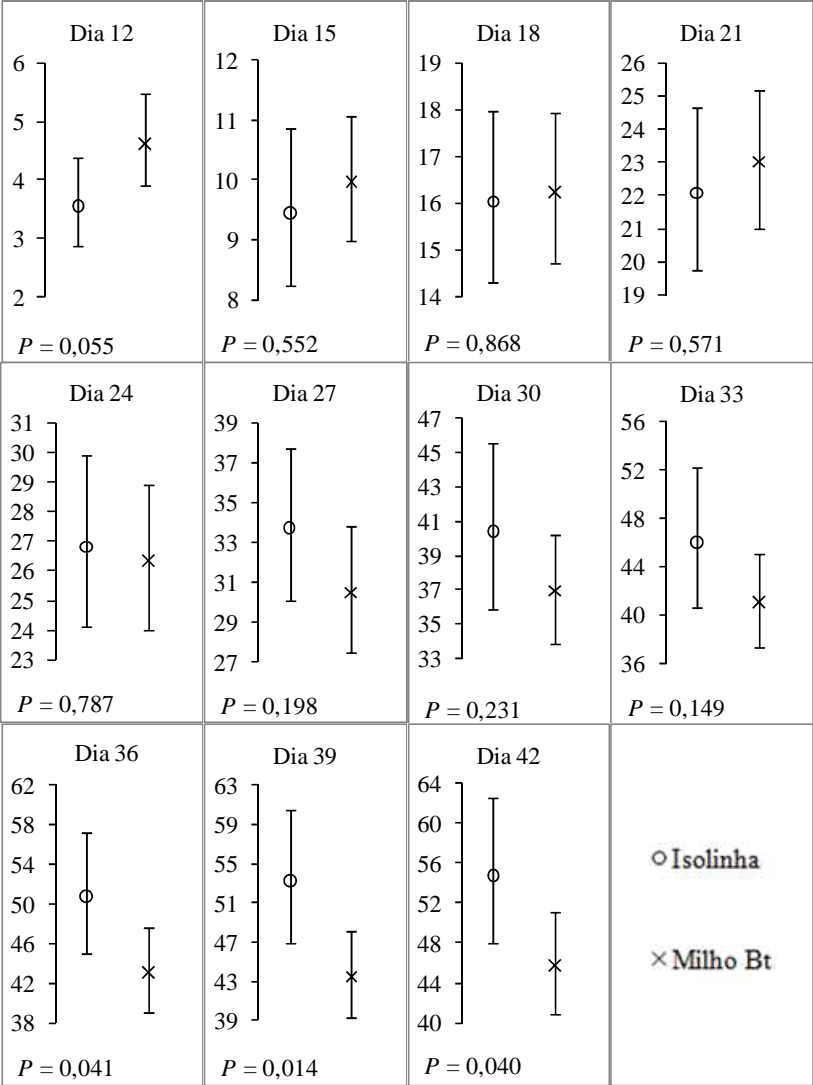


Figura 11 - Fecundidade (juvenis acumulados) média de matrizes de *D. magna* alimentadas com folhas de milho Bt e milho isogênico, ao longo do tempo. Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=90). *P* indica o P-valor obtido no contraste.

5.2.8 Percentagem de Abortos

Assim como para a variável fecundidade, na análise da variável percentagem de abortos (percentagem acumulada de abortos) um modelo Poisson com parâmetro para super-dispersão, assumindo uma estrutura de matriz de covariâncias de independência mostrou o melhor ajuste de acordo com o BIC (Tabela 8), sendo utilizado para realização de inferências.

Tabela 8 - Comparações entre estruturas de matriz de covariância para seleção do modelo de melhor ajuste para análise da variável Percentagem de abortos. O menor valor de QIC (melhor ajuste) está em negrito.

Variável Dependente	Distribuição	Matriz de Variância-Covariância	QIC
Abortos	Poisson + parâmetro para super-dispersão	INDEP	-1555,8
		AR(1)	-1552,9
		UN	Erro

Foi verificado efeito significativo da interação *variedade*tempo* (Tabela 9), rejeitando-se a hipótese nula de que dietas de milho Bt e da isolinha não mostram efeitos diferentes na percentagem de abortos de *D. magna*. A percentagem de abortos foi significativamente diferente no dia 12 ($P < 0,05$), com animais alimentados com folhas de milho isogênico mostrando maior percentagem de abortos do que os animais alimentados com folhas de milho Bt. Posteriormente não foram verificadas diferenças significativas, embora animais alimentados com milho Bt tenham mostrado uma aparente tendência à maior percentagem de abortos em estádios finais da vida (Figura 123).

Tabela 9 - Tabela de análise de GEE para a variável Percentagem de Abortos em matrizes alimentadas com folhas de milho Bt ou milho isolinha (fator variedade) ao longo do tempo (fator tempo).

Estatísticas de Wald para Análise Tipo 3 de GEE			
Fonte de Variação	GL	χ^2	Pr > χ^2
Variedade	1	0,01	0,9315
Tempo	10	70,61	< 0,0001
Variedade*Tempo	10	18,38	0,0489

De acordo com Conde-Porcuna *et al.* (2011), o aborto de ovos subitâneos e ovos de diapausa detém uma grande influência em populações de *D. magna*, tanto no laboratório quanto no meio natural. Dao *et al.* (2010) relacionaram a redução da fecundidade total de *D. magna* ao aborto de ovos em animais expostos a microcistina, em condições de alta toxicidade que incluíram elevação da mortalidade. A maior percentagem inicial de abortos em dafnídeos alimentados com folhas da isolinha pode indicar uma menor alocação de recursos para a reprodução inicial. Animais alimentados com folhas de milho Bt neste estudo tenderam a maiores porcentagens de aborto acumuladas em estádios tardios da vida (cerca de 17% (ou oito abortos por fêmea) para milho Bt contra 11% (ou seis abortos por fêmea) para milho isogênico, no dia 42 ($P = 0,08$)), embora estas diferenças não tenham sido significativas.

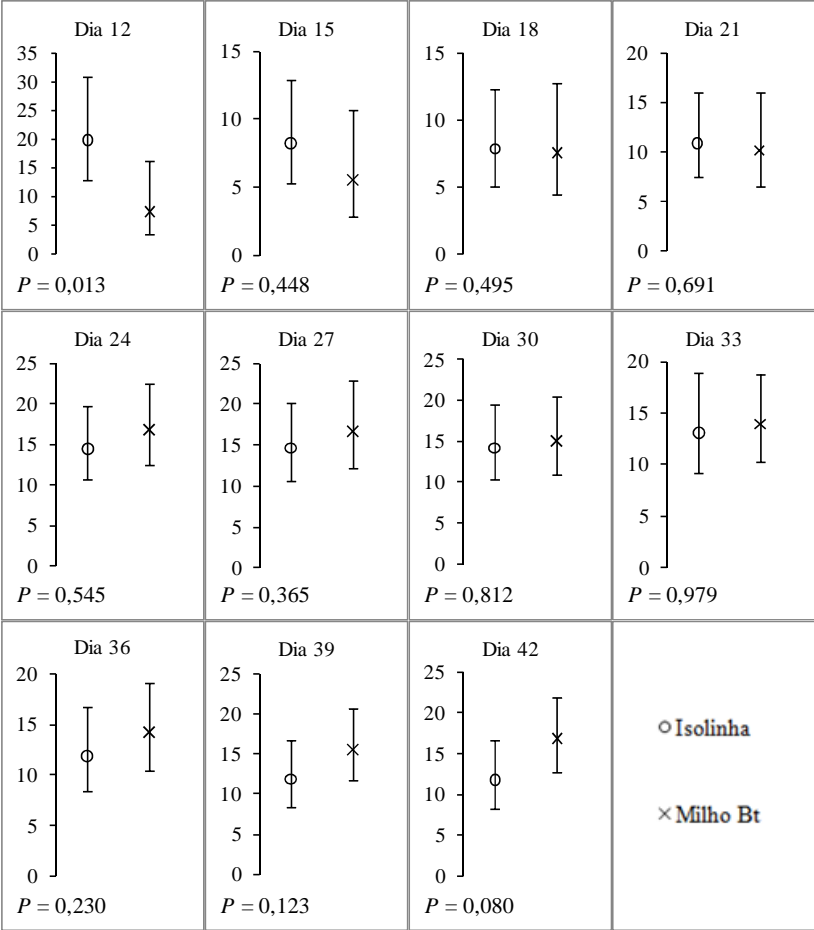


Figura 122 - Percentagem de abortos acumulada ((acúmulo de abortos/total de juvenis)*100) média de matrizes de *D. magna* alimentadas com folhas de milho Bt e milho isogênico, ao longo do tempo. Barras indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade (n=90). *P* indica o P-valor obtido no contraste.

5.2.9 Produção de *Ephippia*

Foi encontrada associação entre a produção de *ephippium* (Tabela 10) e a dieta provida aos animais (folhas de milho Bt ou da isolinha) ($P = 0,023$, teste exato de Fisher), rejeitando-se a hipótese nula. Ao todo 18 animais produziram *ephippium* (ovo de dormência) durante o experimento, sendo 14 destes animais alimentados com folhas de milho

Bt e quatro com folhas de isolinha (Figura 13). Quatro animais sob a dieta com milho Bt produziram *ephippium* duas vezes, de modo que o número total de *ephippia* produzidas neste tratamento (18 *ephippia*) foi maior do que o número de animais que produziram *ephippium* (14 animais).

Tabela 10 - Tabela de contingência para a variável produção de *ephippium* em fêmeas de *D. magna* sob dietas à base folhas de milho Bt e da variedade isolinha.

	Não Produziu	Produziu	Total
Isolinha	86	4	90
Milho Bt	76	14	90
Total	162	18	180

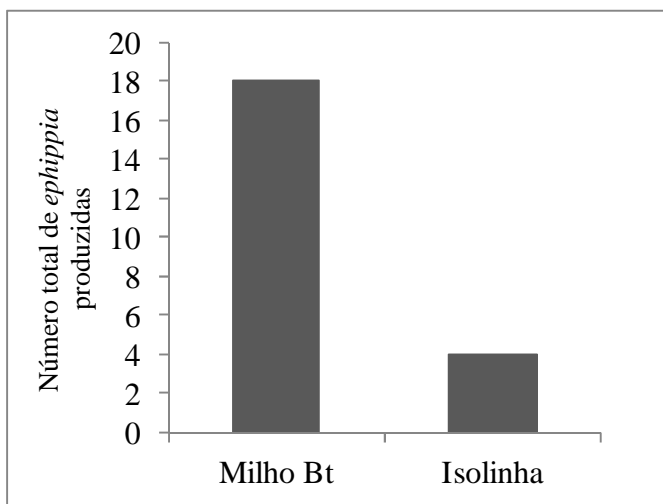


Figura 13 - Número total de *ephippia* produzidas por *D. magna* sob dietas de folhas de milho transgênico e da isolinha, ao longo de 42 dias. N=90.

A produção de *ephippia* (estruturas protetoras que encerram ovos de diapausa, comumente produzidos sexualmente em *D. magna*) foi uma surpresa no estudo, já que todos os animais experimentais foram checados e confirmados como fêmeas, e os juvenis permaneciam no máximo três dias com as mães (tempo de renovação do meio de cultivo), de modo que mesmo se houve produção de machos partenogênicos (o

que não foi avaliado), argumenta-se que não houve tempo suficiente para o amadurecimento de suas gônadas e fecundação das matrizes. Fêmeas de *Daphnia pulex* podem produzir ovos de dormência assexuadamente (Hebert, 1987), embora usualmente cladóceros produzam juvenis machos na eminência de eventos catastróficos, para então produzirem ovos de diapausa sexuadamente (Hebert, 1978). Fêmeas fecundadas de *Daphnia* podem produzir *ephippia* contendo um ou dois ovos de dormência, e *ephippia* vazias já foram reportadas em fêmeas não fecundadas (Winsor & Innes, 2002; Cáceres & Tessier, 2004). Ovos de dormência podem contornar condições ambientais adversas temporárias, a sua produção é vantajosa para fêmeas que detectam sinais de degradação ambiental, como seca, acumulação de resíduos e escassez de alimentos (Ban *et al.*, 2009).

Na literatura são reportados dois outros estudos nos quais foram encontradas *ephippia* contendo ovos de diapausa sem a fertilização por machos em *D. magna* (Vollmer, 1960; Bouchnak & Steinberg, 2010). Assim como relatado por Bouchnak & Steinberg (2010) as *ephippia* assexuadamente produzidas neste estudo eram similares às *ephippia* produzidas sexualmente e continham dois ovos cada, embora faltem provas moleculares sobre a ploidia destes ovos até o momento. Volmer (1960) e Bouchnak & Steinberg (2010) observaram a produção assexuada de ovos de diapausa em condições de baixa qualidade nutricional. Um maior número de animais alimentados com folhas de milho Bt produziu *ephippia*, o que poderia estar relacionado tanto à baixa qualidade nutricional quanto a um efeito tóxico.

Uma apreciação geral dos resultados obtidos no presente estudo indica efeitos adversos de uma variedade de milho Bt em parâmetros relacionados ao *fitness* de *D. magna* alimentada com folhas de milho, em um experimento duplo-cego completamente aleatorizado conduzido em laboratório.

Na natureza, a quantidade e a qualidade de alimento são frequentemente limitantes para zooplâncton, já que ambientes naturais tendem a ser nutricionalmente diluídos, salvo no caso de lagos eutrofizados e com florações de algas (Chandini, 1989). Neste contexto, admite-se que tanto a condição de controle interno (dieta exclusiva de *S. dimorphus*, usualmente empregada em testes padrão com *Daphnia*) quanto as dietas à base de folhas de milho são artificiais, já que na natureza dafnídeos têm uma diversidade de partículas orgânicas à sua disposição, em concentrações variáveis. Não obstante, em termos energéticos, ambas as situações são possíveis. Ainda assim, embora se considere este tipo de teste controlado como um importante componente

inicial da análise de risco, extrapolações para efeitos a campo devem ser cuidadosas, o que ressalta a necessidade de testes rigorosos a campo.

Matcalfe & Monagham (2001) advogam que efeitos de longo prazo em parâmetros relacionados ao *fitness* devem ser encarados mais seriamente em estudos empíricos e teóricos, de modo a se compreender a escala temporal das consequências da realocação de recursos, sendo esta a pedra angular da teoria de história de vida. Ainda segundo Metcalfe & Monagham (2001), efeitos ambientais negativos podem ser muito sutis e de difícil detecção, especialmente se aparecem apenas em estádios avançados da vida; em muitos casos, efeitos ecológicos importantes só podem ser detectados em estudos longitudinais de longo prazo. O fato de este tipo de efeito ter sido detectado no presente estudo, que cobriu 42 dias da vida de *D. magna*, atesta a sensibilidade do método empregado, de modo a encorajar testes que cubram a maior parte ou, de preferência, a totalidade da vida dos indivíduos, lembrando que de acordo com o Princípio da Precaução, “quando houver ameaça de danos graves ou irreversíveis, a ausência de certeza científica absoluta não será utilizada como razão para o adiamento de medidas economicamente viáveis para prevenir a degradação ambiental”.

A alocação de recursos disponíveis entre crescimento e reprodução é uma resposta comum a estresses e detém claramente uma importância chave na dinâmica de populações de *D. magna*, afetando tanto a sobrevivência de adultos quanto a estrutura populacional (em função da reprodução) (Bradley *et al.*, 1991). Isto é especialmente notável durante períodos com limitação de recursos – uma condição frequentemente encontrada por zooplâncton no campo (McCauley *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 1991). Estudos empíricos têm mostrado que fêmeas frequentemente realocam recursos da reprodução para manutenção ou vice-versa como resposta a estresses nutricionais, buscando melhor adaptabilidade (Twombly *et al.*, 1998 e referências contidas). De acordo com Stefano *et al.* (2002) estresse pode ser definido como um tipo de estímulo suficientemente forte e durável para desequilibrar uma resposta típica a alguma perturbação, considerando seus parâmetros dinâmicos. A resposta ao estresse se desenvolve a partir da resposta à perturbação e envolve moléculas indutoras de sinalização, tais como citocinas e neuropeptídeos.

Neste estudo, folhas de milho Bt induziram uma fecundidade inicial maior, embora a diferença tenha sido marginalmente significativa. Adicionalmente, em estádios avançados os dafnídeos alimentados com folhas de milho Bt mostraram crescimento e fecundidade significativamente menores, e produziram mais ovos de dormência.

Estes resultados podem ser explicados por dois mecanismos, não mutuamente excludentes, relacionados a características do milho Bt: primeiro, a inserção aleatória do cassete de MON810 no genoma do milho poderia causar efeitos pleiotrópicos ou epigenéticos relacionados à expressão diferencial de metabólitos existentes, à produção de novos metabólitos, ou à sinergismos entre a proteína recombinante e metabólitos endógenos da planta hospedeira, acarretando efeitos não intencionais na qualidade nutricional do material vegetal (Hilbeck & Schmidt, 2006; Saxena & Stotzky, 2001); segundo, a toxina Cry1Ab truncada poderia exercer um leve efeito tóxico em *D. magna*, conforme hipotetizado por Bøhn *et al.* (2008), através de um modo de ação não elucidado.

Crickmore (2005) apontou que diferenças sutis não identificadas na estrutura das toxinas Bt expressas por plantas Bt poderiam afetar a especificidade de ligação e de hospedeiros. Neste estudo foi detectada uma banda de tamanho inesperado (~35 kDa) para Cry1Ab através de *immunoblotting*, além da banda esperada de 69 kDa nas plantas de milho Bt utilizadas neste estudo. Grubber *et al.* (2011) encontraram bandas imunorreativas de Cry1Ab com 42 kDa, 34 kDa e 17kDa, adicionalmente à uma banda de 65 kDa, em plantas de milho, ração para bovinos contendo milho GM e nas fezes de bovinos. Segundo os mesmos autores, a ocorrência destes fragmentos imunorreativos nas plantas de milho GM indica uma degradação continua da proteína recombinante Cry1Ab por proteases endógenas do milho. Paul *et al.* (2010) verificaram que a proteína de 34 kDa foi a mais proeminente em ração bovina contendo milho GM, bem como em material parcialmente digerido e fezes bovinas, sugerindo que esta proteína seja mais estável à atividade proteolítica, o que pode ser relevante em termos de efeitos e interações do milho transgênico com outros organismos e o ambiente em agroecossistemas.

Em avaliação pré-aprovação de árvores transgênicas, Axelsson *et al.* (2011) verificaram que híbridos de *Populus* transformados para expressar toxinas Bt induziram uma alteração de até 33% na composição de insetos aquáticos colonizando a serrapilheira de *Populus* transgênico em corpos d'água, em comparação ao tipo selvagem isogênico. Embora estes autores não tenham logrado indicar o mecanismo por trás destes resultados, tanto efeitos pleiotrópicos quanto um efeito tóxico da toxina Bt foram sugeridos como possíveis. Do mesmo modo, este estudo não provê evidências conclusivas quanto ao mecanismo que induziu os efeitos observados em *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt, mas os resultados como um todo parecem indicar que efeitos

pleiotrópicos decorrentes da transformação genética do milho estejam envolvidos, embora não se possa excluir totalmente um efeito tóxico não-alvo de Cry1Ab. Saxena & Stotzki (2001) constataram a ocorrência de um efeito pleiotrópico em diversas variedades de milho Bt (incluindo variedades com o evento MON810), onde diversos tecidos, incluindo folhas, mostraram teores significativamente mais elevados de lignina do que as isolinhas com o mesmo *background* genético. Os mesmos autores enfatizaram que tais efeitos podem exercer importantes impactos ecológicos em agroecossistemas, já que a concentração de lignina está relacionada à habilidade de herbívoros de digerir material vegetal. De modo geral, maiores teores de fibra (celulose, hemicelulose e lignina) em material foliar poderiam dificultar a assimilação de nutrientes por dafnínidos e outros herbívoros, o que consiste em uma possível explicação adicional para as diferenças observadas no crescimento e reprodução de *D. magna* neste estudo. Como neste estudo os indivíduos de *D. magna* receberam a mesma quantidade de material foliar independentemente do tratamento, é possível que *D. magna* alimentada com folhas de milho Bt tenha recebido uma maior quantidade de carbono (refletida num possível maior teor de lignina). Deste modo, se a quantidade de carbono tivesse sido corrigida para possíveis diferenças variedade-específicas, os dafnínidos expostos a milho Bt receberiam uma menor quantidade de alimento, e um efeito negativo mais pronunciado de milho Bt seria esperado.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo provê novas evidências de que o milho transgênico mostra efeitos crônicos adversos em um organismo modelo não alvo, em comparação à sua linha isogênica. Embora variedades de milho Bt e suas linhas isogênicas tenham sido consideradas substancialmente equivalentes, os resultados deste e de outros estudos acerca dos riscos de milho Bt dão suporte ao argumento de que o conceito de equivalência substancial é mal definido, e inadequado no seu emprego em avaliações de risco de OGMs. Argumenta-se que um princípio de regulamentação deveria se basear na atividade biológica dos OGMs e suas interações com outros organismos e o ambiente. Para tanto, preconiza-se a realização de avaliações de longo prazo em abordagem caso-a-caso, nos níveis nutricional, molecular, toxicológico e ecológico de OGMs, tais como este estudo. Por fim, considera-se estudos como o aqui apresentado como componentes iniciais indispensáveis na avaliação de risco de OGMs para o ambiente, a saúde humana e animal, tendo por base o Princípio da Precaução conforme recomendado na Convenção da Biodiversidade e no Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança.

REFERÊNCIAS

- ABEL C.A. & ADAMCZYK, J.J. Jr. Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. *Journal of Economic Entomology*, v. 97, p. 1737–1744. 2004
- ADEMA, M.M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, v. 59, p. 125–134. 1978.
- ALEKSEEV, V. & LAMPERT, W. Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. *Nature*, v. 414, p. 899-901. 2001.
- ALLARD, R. W. *Principles of Plant Breeding*. New York, London: John Wiley & Sons Inc. 1960. 485p.
- AMMANN, K. Effects of biotechnology on biodiversity: herbicide-tolerant and insect-resistant GM crops. *Trends in Biotechnology*, v. 23, p. 388-394. 2005.
- ANDOW, D. A. & HILBECK A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. *BioScience*, v. 54, p. 637- 649. 2004.
- ASHOURI, A.; MICHAUD, D. & CLOUTIER, C. Unexpected effects of different potato resistance factors to the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on the potato aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, v. 30, p. 524–532. 2001.
- AXELSSON, E.P.; HJÄLTÉN, J.; LEROY, C.J.; WHITHAM, T.J.; JULKUNEN-TIITTO, R. & WENNSTRÖM, A. Leaf litter from insect-resistant transgenic trees causes changes in aquatic insect community composition. *Journal of Applied Ecology*, v. 48, p. 1472–1479. 2011.
- BADGLEY, C.; MOGHTADER, J.; QUINTERO, E.; ZAKEM, E.; CHAPPELL, M.J.; AVILÉS-VÁZQUEZ, K.; SAMULON, A. & PERFECTO, I. Organic agriculture and the global food supply. *Renewable Agriculture and Food Systems*. v. 22, p. 86-108. 2007.

BAN, S.; TENMA, H.; MORI, T. & NISHIMURA, K. Effects of physical interference on life history shifts in *Daphnia pulex*. Journal of Experimental Biology. v. 212, p. 3174-3183. 2009.

BARTSCH, D.; DEVOS, Y.; HAILS, R.; KISS, J.; KROGH, P. H.; MESTDAGH, S.; NUTI, M.; SESSITSCH, A.; SWEET, J. & GATHMANN, A. Environmental impact of genetically modified maize expressing Cry1 proteins. In: KEMPKEN, F.; JUNG, C. (Eds.). Genetic Modification of Plants: Agriculture, Horticulture and Forestry. Springer. 2010.

BEATON, M.J. & HEBERT P.D.N. Variation in chromosome numbers of *Daphnia* (Crustacea, Cladocera). Hereditas, v. 120. p. 275-279. 1994.

BENZIE, J.A.H. Cladocera: the genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*). In: Dumont, H.J.F. (ed.). Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 21. Kerkwerve, The Netherlands: Backhuys Publishers. 2005. 368p.

BERNHARD, K; JARRET, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D.J.; ROBERTS, G.M.; PAULI, S.; RODGERS, P. & BURGESS, H.D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. Journal of Invertebrate Pathology. v. 70, p. 59–68. 1997.

BØHN, T., PRIMICERIO, R. & TRAAVIK, T. Reduced Fitness of *Daphnia magna* Fed a Bt-Transgenic Maize Variety. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 55, p. 584–592. 2008.

BØHN, T.; TRAAVIK, T. & PRIMICERIO, R.; Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic Bt-maize. Ecotoxicology, v. 19, p. 419-43. 2010.

BOUCHNAK, R. & STEINBERG, C.E.W. Modulation of longevity in *Daphnia magna* by food quality and simultaneous exposure to dissolved humic substances. Limnologia. v. 40, p. 86–91. 2010.

BRADLEY, M.C.; BAIRD, D.J. & CALOW, P. Mechanisms of energy allocation to reproduction in the cladoceran *Daphnia magna* Straus. Biological Journal of the Linnean Society, v. 44, p. 325-333. 1991.

BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biosegurança (CTNBio). Parecer Técnico Nº 1.100/2007. 2008.

BRASIL. Lei Nº 11.105, de 24 de Março de 2005.

BRIGGS, F.N. & KNOWLES, P. F. Introduction to Plant Breeding. Reinhold Publishing Corporation. 1967. 426p.

BRUNS, H.A. & ABEL, C.A. Nitrogen fertility effects on Bt deltaendotoxin and nitrogen concentrations of maize during early growth. *Agronomy Journal*. v. 95, p. 207–211. 2003.

BUHL, K.J., HAMILTON, S.J. & SCHMULBACH, J.C. Chronic toxicity of the bromoxynil formulation Buctril to *Daphnia magna* exposed continuously and intermittently. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 25, p. 152–159. 1993.

CÁCERES, C. E. & TESSIER, A. J. Incidence of diapause varies among populations of *Daphnia pulicaria*. *Oecologia*. v. 141, p. 425–431. 2004.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.V.; ENGEL, K.H.; GATEHOUSE, A.M.; KÄRENLAMPI, S.; KOK, E.J.; LEGUAY, J.J.; LEHESRANTA, S.; NOTEBORN, H.P.; PEDERSEN, J. & SMITH, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 1089–1125. 2004.

CERA. GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. 2010.

CHADWICK, W. & LITTLE, T.J. A parasite-mediated life-history shift in *Daphnia magna*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. v. 272, p. 505–509. 2005.

CHAMBERS, C.P., WHILES, M.R., ROSI-MARSHALL, E.J., TANK, J.L., ROYER, T.V., GRIFFITHS, N.A., EVANS-WHITE, M.A. & STOJAK, A.R. Responses of stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus. *Ecological Applications*. v. 20, p. 1949–1960. 2010.

CHANDINI, T. Survival, Growth and Reproduction of *Daphnia carinata* (Crustacea: Cladocera) Exposed to Chronic Cadmium Stress at Different Food (*Chlorella*) Levels. *Environmental Pollution*, v. 60, p. 29-45. 1989.

CONDE-PORCUNA, J.M; VALDÉS, F.J.; ROMO, S. & PÉREZ-MARTÍNEZ. Ephippial and subitaneous egg abortion: relevance for an obligate parthenogenetic *Daphnia* population. *Journal of Limnology*. v. 70, n. 1, p. 69-75. 2011.

COX, D. R. Regression Models and Life Tables (with Discussion). *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, v. 34, p. 87 – 220. 1972.

CRECCHIO, C. & STOTZKY, G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 30, p. 463–470. 1998.

CRICKMORE, N. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends in Microbiology*. v. 13, p. 347–350. 2005.

CZARNECKI, O., HENNING, M., LIPPERT, I. & WELKER, M. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environmental Microbiology*. v. 8, p. 77–87. 2006.

DAO, T.S., DO-HONG, L. & WIEGAND, C. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicol.* v. 55, p. 1244–1254. 2010.

DUCHET, C.; COUTELLE, M.A.; FRANQUET, E.; LAGNEAU, C. & LAGADIC, L. Population-level effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna*: comparison of laboratory and field microcosm exposure conditions. *Ecotoxicology*. v. 19, n.7, p. 1224-1237. 2010.

EBERT, D. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD), USA: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2005.

ELENDT, B.P. Selenium deficiency in Crustacea: An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*. v. 154, p. 25-33. 1990.

ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J. & HIGGS, S. (eds.) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: Wiley. 1993.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Report of the EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. S2–S70. 2008.

FERMENT, G.; ZANONI, M.; BRACK, P.; KAGEYAMA, P. & NODARI, R.O. Coexistência: o caso do milho. Brasília: MDA. 2009. 56p.

FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. In. LELLEY, T.; BALÁZS, E.; TEPFER, M. (eds.). Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems. Austria: Facultas Verlag und Buchhandels AG. 2002, 218p.

FLEXNER, J.L.; LIGHTHARD, B.; CROFT, B.A. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. *Agricultural Ecosystems and Environment*, v. 16, p. 203-254. 1986.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of Food Insecurity in the World: Economic crises – impacts and lessons learned. FAO. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). World Food Summit - Rome Declaration on Food Security. Rome, Italy: FAO. 1996. Disponível on-line em: <http://www.fao.org/docrep/003/w3613e/w3613e00.htm>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/OMS). Application of the principle of substantial equivalence to the safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology. Report of a WHO Workshop. Geneva: WHO. 1995.

FREITAS, E.C. & ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudocida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 60, n. 2, p. 241-249. 2010.

GELLER, W.; MÜLLER, H. The filtration apparatus of Cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. Oecologia, v. 49, p. 316-321. 1981.

GLAZIER, D.S. Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna*. Ecology, v. 73, p. 910-926. 1992.

GOLDBURG, R.J. & TJADEN, H. Are B.t.k. plants really safe to eat? Bio/Technology, v. 8, p. 1011-1015. 1990.

GRIFFITHS, N.A.; TANK, J.L.; ROYER, T.V.; ROSI-MARSHALL, E.J.; WHILES, M.R.; CHAMBERS, C.P.; FRAUENDORF, R.C. & EVANS-WHITE, M.A. Rapid decomposition of maize detritus in agricultural headwater streams. Ecological Applications, v. 19, p. 133-142. 2009.

GRUBBER, H., PAUL, V., GUERTLER, P., SPIEKERS, H., TICHOPAD, A., MEYER, H.H. & MULLER, M. Fate of Cry1Ab protein in agricultural systems under slurry management of cows fed genetically modified maize (*Zea mays* L.) MON810: A quantitative assessment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 7135-7144. 2011.

HEBERT, P.D.N. The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphniidae). Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, v. 53, p. 387-426. 1978.

HEBERT, P.D.N. Genotypic characteristics of the Cladocera. Hydrobiologia, v. 145, p. 183-193. 1987.

HEDGES, S.B. The origin and evolution of model organisms. Nature Reviews Genetics, v. 3, n. 11, p. 838-849.

HEINNEMANN, J.A. Hope not Hype: The future of agriculture guided by the International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and

Technology for Development. Penang, Malaysia: Third World Network. 2009. 160 p.

HERRING, R.J. Stealth seeds, bioproperty, biosafety, biopolitics. *Journal of Development Studies*, v. 43, n. 1, p. 130–57. 2007.

HEUGENS, E.H.W., TOKKIE, L.T.B., KRAAK, M.H.S., HENDRIKS, A.J. & VAN STRAALLEN, N.M. Population growth of *Daphnia magna* under multiple stress conditions: joint effects of temperature, food, and cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 25, n. 5, p. 1399–1407. 2006.

HILBECK, A. & SCHMIDT, J.E.U. Another view on Bt proteins: how specific are they and what else might they do? *Biopesticides International*. v. 2, n. 1, p. 1–50. 2006.

HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews*, v. 53, p. 242–255. 1989.

HOLST-JENSEN, A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 1071–1082. 2009.

HORTON, P.A. Browsing and grazing by cladoceran filter feeders. *Canadian Journal of Zoology*. v. 57, n. 1, p. 206–212. 1979.

IGNOFFO, C.M. & GARCIA, C. UV–photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. *Environmental Entomology*. v. 7, p. 270–272. 1978.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Water quality-determination of the mortality of *Daphnia magna* Straus (Cladocera:Crustacea). ISO 6241. Geneva, Switzerland: ISO. 1982.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 10706. Geneva, Switzerland: ISO. 2000.

JAMES, C. Executive Summary of *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011*. ISAAA Brief No. 43. Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). 2011.

KLEIVEN, O.T.; LARSSON, P. & HOBÆK, A. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *OIKOS*, v. 65, p. 197-206. 1992.

KRUGER, M.; VAN RENSBURG, J.B.J. & VAN DEN BERG, J. Perspective on the development of stem borer resistance to Bt maize and refuge compliance at the Vaalharts irrigation scheme in South Africa. *Crop Protection*, v. 28, p. 684-689. 2009.

KUHL, A. & LORENZEN, H. Handling and culturing of *Chlorella*. In: PRESCOTT, D.M. (ed.). *Methods in cell physiology*, Vol. 1, p. 152-187. New York and London: Academic Press. 1964.

KUIPER, H.A., KLETER, G.A., NOTEBORN, H.P. & KOK, E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*. v. 27, p. 503-528. 2001.

LACEY, L.A. & SIEGEL, J.P. Safety and ecotoxicity of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A. & NIELSEN-LEROUX, C. (eds.), *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 2000. pp. 253-273.

LAMPERT, W. & SOMMER, U. *Limnoecology: the Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, New York, 1997.

LAMPERT, W. *Daphnia*: Model herbivore, predator and prey. *Polish Journal Of Ecology*, v. 54, p. 607-620. 2006.

LATSHAW, W.L. Elemental composition of the corn plant. *Journal of Agricultural Research*, v. 27, n. 2, p. 845-860. 1924.

LIANG, K.Y. & ZEGER, S. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika*, v. 73, n. 1, p. 13-22. 1986

LITTELL, R.C., MILLIKEN, G.A., STROUP, W.W., WOLFINGER, R.D. & SCHABENBERGER, O. SAS® for Mixed Models, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2006. 824p.

LU, Y.; WU, K.; JIANG, Y.; XIA, B.; LI, P.; FENG, H.; WYCKHUYS, K.A.G. & GUO, Y. Mirid Bug Outbreaks in Multiple Crops Correlated with Wide-Scale Adoption of Bt Cotton in China. *Science*, v. 328, n. 5982, p. 1151-1154. 2010.

LÜRLING, M. & VAN DER GRINTEN, E. Life-history characteristics of *Daphnia magna* exposed to dissolved microcystin-LR and to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with and without microcystins. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 22, p. 1281–1287. 2003.

LUTHE, P.; CORDIER, J.; FISHER, H. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and applications. In: KURSTAK, E. (ed.). *Microbial and viral pesticides*, New York: Marcel Dekker. 1982. pp. 35-74.

LYNCH, J.P. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany*, v. 55, n. 5, p. 493-512. 2007.

MARTÍNEZ, C. & CABALLERO, P. Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 745–752. 2002.

MARVIER, M.; MCCREEDY, C.; REGETZ, J. & KAREIVA, P. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on non-target invertebrates. *Science*, v. 316, p. 1475–1477. 2007.

MATSON, P.A.; PARTON, W.J.; POWER, A.G. & SWIFT, M.J. Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science*, v. 277, p. 504–509. 1997.

MCCAULEY, E.; MURDOCH, W.W.; NISBET, R.M. & GURNEY, W.S.C. The physiological ecology of *Daphnia*: Development of a model of growth and reproduction. *Ecology*, v. 71, p. 703-715. 1990.

MCCULLAGH, P. & NELDER, J. A. Generalized Linear Models, Second Edition, London: Chapman and Hall, 1989.

MCGAUGHEY, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, v. 229, p. 193-195. 1985.

MCGAUGHEY, W.H. & WHALON, M.E. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science, v. 258, p. 1451-1455. 1992.

METCALFE, N.B. & MONAGHAN, P. Compensation for a bad start: grow now, pay later? Trends in Ecology & Evolution. v. 16, n. 5. 2001.

MILLSTONE, E.; BRUNNER, E. & MAYER, S. Beyond, 'substantial equivalence'. Nature, v. 401, p. 525-526. 1999.

MÜLLER-NAVARRA, J.D. Biochemical versus mineral limitation in *Daphnia*. Limnology and Oceanography. v. 40, p. 1209-1214. 1995.

NELDER, J. A. & WEDDERBURN, R. W. M. Generalized Linear Models. Journal of the Royal Statistical Society A, v. 135, p. 370-384, 1972.

NGUYEN, T.H. & JEHLE, J.A. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON 810. Journal of Plant Diseases Protection. v. 114, p. 82-87. 2007.

OBRYCKI, J.J.; LOSEY, J.E.; TAYLOR, O.R. & JESSE, L.C.H. Transgenic insecticidal corn: beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. BioScience, v. 51, p. 353-361. 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles. Paris: OECD. 1993.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guideline For Testing Of Chemicals 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test. Paris: OECD. 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guideline For Testing Of Chemicals 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris: OECD. 2008.

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LOPEZ, S.L. & CARRASCO, A.E. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signalling. *Chemical Research in Toxicology*. v. 23(10), p. 1586–1595. 2010.

PAN, W. Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics*, v. 57, n. 1, p. 120–125. 2001.

PAN, W., LOUIS, T.A. & CONNETT, J.E. A Note on Marginal Linear Regression with Correlated Response Data. *The American Statistician*, v. 54, n. 3, p. 191-195. 2002.

PAUL, V., GUERTLER, P., WIEDEMANN, S. & MEYER, H.H.D. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total dietary feed proteins in dairy cow digestion. *Transgenic Research*. v. 19, p. 683-689. 2010.

POTÉ, J.; ACKERMANN, R. & WILDI, W. Plant leaf mass loss and DNA release in freshwater sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 72, p. 1378-1383. 2009.

POWLES, S.B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science*. v. 64, p. 360–365. 2008.

PRETTY, J.N. The rapid emergence of genetic modification in world agriculture: contested risks and benefits. *Environmental Conservation*. v. 28, n. 3, p. 248–62. 2001.

RASBAND, W.S. (1997-2008) ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. How a Corn Plant Develops (Special Report 48), Ames, Iowa: Iowa State University of Science and Technology/Cooperative Extension Service. 1992. Disponível on-line em:

ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; HANSEN, P.E.; ZHANG, W.; CZARNECKI, O.; HENNING, M.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; NEILAN, B.A. & KAEBERNICK, M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite

toxic to *Daphnia*. Journal of Chemical Ecology. v. 29, p. 1757–1769. 2003.

ROSATI, A.; BOGANI, P.; SANTARLASCI, A. & BUIATTI, M. Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard maize. Plant Molecular Biology. v. 67, n. 3, p. 271–281. 2008.

ROSI-MARSHALL, E.J.; TANK, J.L.; ROYER, T.V.; WHILES, M.R.; EVANS-WHITE, M.; CHAMBERS, C.; GRIFFITHS, N.A.; POKELSEK, J. & STEPHEN, M.L. Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. v. 104, n. 41, p. 16204–16208. 2007.

ROUTTU, J.; JANSEN, B.; COLSON, I.; DE MEESTER, L. & EBERT, D. The first-generation *Daphnia magna* linkage map. BMC Genomics 2010, 11:508. 2010.

SAS INSTITUTE (2006) SAS version 9.2. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.

SAXENA, D. & STOTZKY, G. *Bt* corn has a higher lignin content than Non-*bt* corn. American Journal of Botany. v. 88, n. 9, p. 1704–1706. 2001.

SCHÄFFER, J.C. *Die grünen Armpolypen, die geschwänzten und ungeschwänzten zackigen Wasserflöhe und eine besondere Art kleiner Wasseraale*. Germany: Regensburg. 1755. 96p.

SCHAUZU, M. The concept of substantial equivalence in safety assessment of foods derived from genetically modified organisms. AgBiotechNet, v. 2. 2000. p. 1–4.

SCHMIDT, J.E.U. Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. v. 56, n. 2, p. 221–228. 2009.

SCHWARZ, G. Estimating the Dimension of a Model. Annals of Statistics, v. 6, p. 461–464. 1978.

SÉRALINI, G-E.; MESNAGE, R.; CLAIR, E.; GRESS, S.; VENDÔMOIS, J.S. & CELLIER, D. Genetically modified crops safety assessments: present limits and possible improvements. *Environmental Sciences Europe*, p. 23:10. 2011. Disponível em: <http://www.enveurope.com/content/23/1/10>.

SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z. & ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology*. v. 47, p. 845–881. 2002.

STEARNS, F.W. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. *Genetics*. v. 186, p. 767–773, 2010.

STEFANO, G.B.; CADET, P.; ZHU, W.; RIALAS, C.M.; MANTIONE, K.; BENZ, D.; FUENTES, R.; CASARES, F.; FRICCHIONE, G.L.; FULOP, Z. & SLINGSBY, B. The blueprint for stress can be found in invertebrates. *Neuroendocrinology Letters*. v. 23, p. 85–93. 2002.

STEINBERG, C.E.W, OUERGHEMMI, N., HERRMANN, S., BOUCHNAK, R., TIMOFEYEV, M.A. & MENZEL, R. Stress by poor food quality and exposure to humic substances: *Daphnia magna* responds with oxidative stress, lifespan extension, but reduced offspring numbers. *Hydrobiologia*. v. 652, p. 223–236. 2010.

SWAN, C.M.; JENSEN, P.D.; DIVELY, G.P. & LAMP, W.O. Processing of transgenic crop residues in stream ecosystems. *Journal of Applied Ecology*, v. 46, p. 1304–1313. 2009.

SZÉKÁCS, A.; LAUBER, E.; TAKÁCS, E. Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON810 transgenic maize. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 396, p. 2203–2211. 2010.

TABASHNICK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, v. 38, p. 47–49. 1994.

THEN, C. Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis* – synergism, efficacy, and selectivity. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, p. 791–797. 2010.

TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. v. 96, p. 5995-6000. 1999.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D. & SWACKHAMER, D. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. Science, v. 292, p. 281-284. 2001.

TWOMBLY, S., CLANCY, N. & BURNS, C.W. Life history consequences of food quality in the freshwater copepod *Boeckella triarticulata*. Ecology, v. 79, n. 5, p. 1711-1724. 1998.

UNITED NATIONS CONFERENCE ON ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT (UNCED). Rio Declaration on Environment and Development. 1992. Disponível on-line em: www.unep.org/Documents/Multilingual/Default.asp?documentid=78&articleid=1163

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms 3rd ed., Washington, DC: U.S. EPA. 1993.

UPHOFF, N. Agroecological alternatives: capitalising on existing genetic potentials. Journal of Development Studies, v. 43, p. 218-236. 2007.

VAN LEEUWEN, C.J., LUTTMER, W.J. & GRIFFIEON, P.S. The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: a cadmium example. Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 9, p. 26-39. 1985.

VAN RIE, J. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, v. 247, p. 72-74.

VILLARROEL, M.J.; SANCHO, E. & FERRANDO, M.D. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. Chemosphere. v. 53, p. 857-864. 2003.

VOLLMER, C. Wasserflöhe, 3rd ed. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg, Lutherstadt. 1960.

WACKER, A. & MARTIN-CREUZBURG, D. Allocation of essential lipids in *Daphnia magna* during exposure to poor food quality. Functional Ecology. v. 21, p. 738–747. 2007.

WINSOR, G.L. & INNES, D.J. Sexual reproduction in *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera): observations on male mating behavior and avoidance of inbreeding. Freshwater Biology. v. 47, p. 441–450. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO/OMS). 20 questions on genetically modified foods. Disponível on-line em:
www.who.int/foodsafety/publications/biotech/20questions/en/.